



**Ana Carvalhais dos  
Santos**

**Mortalidade de juvenis de *Venerupis corrugata*  
(Gmelin, 1791) por stresse salino e térmico**

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
Ano 2018

**Ana Carvalhais dos  
Santos**

**Mortalidade de juvenis de *Venerupis corrugata*  
(Gmelin, 1791) por stresse salino e térmico**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais

## **o júri**

presidente

Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves  
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

arguente principal

Doutora Milene Pereira Gomes Canedo Rato  
Colaboradora do Laboratório Associado Centro de Estudos do Ambiente e do Mar

orientador

Prof. Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso  
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Gostaria de deixar vários agradecimentos às pessoas que tornaram esta jornada possível:

Ao Professor Carlos Miguez, pela confiança que depositou em mim, pela sua orientação excepcional e pela simpatia.

Ao Professor Mário Pacheco, à Cláudia e à Bárbara, pela oportunidade que me concederam e pela ajuda fundamental no laboratório.

À Joana e à Daniela, pelo companheirismo, disponibilidade e ajuda constante na aquacultura.

À Susana e à Belucha, pelas dicas sábias e pela partilha de experiência.

Ao Joaquim, pela amizade e ajuda nos últimos anos.

Ao António e aos restantes companheiros do LEME, pela boa disposição diária.

E um agradecimento especial aos meus pais, aos meus irmãos e ao Henrique por todo o apoio que demonstraram ao longo dos anos.

Obrigada!

## palavras-chave

*Venerupis corrugata*, amêijoa-macha, juvenis, aquacultura, temperatura, salinidade, índice de condição.

## resumo

A amêijoa-macha *V. corrugata* é uma espécie de bivalve nativa da Ria de Aveiro e com elevada importância comercial em Portugal. Uma vez que se observou uma elevada mortalidade de juvenis desta espécie num ensaio de aquacultura realizado na Ria de Aveiro em 2015/2016, a qual aconteceu durante um período de intensa precipitação e aumento rápido de temperatura, este trabalho tem como principal objectivo avaliar a tolerância desta espécie a estes factores ambientais. Pretende, igualmente, avaliar se a variação gradual ou repentina da salinidade provoca maior ou menor mortalidade nestes juvenis e se o nível de mortalidade é influenciado pela condição dos animais. Uma vez que a correcção da salinidade nos tanques de aquacultura pode ser feita pela adição de sal, este trabalho pretende também avaliar a toxicidade causada por soluções com elevada concentração salina nestes animais. A amêijoa-macha apresentou uma mortalidade elevada a partir de 3 dias de exposição a salinidade  $\leq 15$  psu. Da mesma forma, observou-se uma mortalidade muito acentuada nas salinidades mais altas (47,5 e 50 psu) a partir de 3 dias de exposição. A diminuição repentina de salinidade provocou uma maior taxa de mortalidade do que a variação gradual. Os indivíduos mostraram, também, uma mudança de comportamento quando expostos a alterações abruptas de salinidade ( $\leq 15$  psu e  $\geq 47,5$  psu) através do fecho das valvas. A amêijoa-macha mostrou ser tolerante a temperaturas da água até 25°C para o tempo máximo de exposição testado (9 dias), mas verificou-se um aumento de mortalidade significativo para 28°C a partir de 48h de exposição. Testou-se também a interacção da salinidade e temperatura na mortalidade dos juvenis, a qual foi significativa, sendo evidente que a temperatura alta faz aumentar a mortalidade quando os animais são expostos a salinidades baixas. Determinou-se também a resposta bioquímica das enzimas catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD), assim como a peroxidação lipídica (LPO), nas células de juvenis de amêijoa-macha expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 22 dias de exposição. Os resultados mostram que tanto a GST como a SOD têm um papel importante na protecção celular dos juvenis e a CAT mostrou ser o melhor indicador do stresse salino e térmico. Verificou-se ainda que, apesar de ter ocorrido indução das enzimas antioxidantes nas diferentes salinidades e temperaturas, os mecanismos de defesa foram insuficientes para evitar a peroxidação lipídica.

## keywords

*Venerupis corrugata*, pullet carpet shell, juveniles, aquaculture, temperature, salinity, condition index.

## abstract

The pullet carpet shell *V. corrugata* is a native bivalve from Ria de Aveiro and presents an important commercial value in Portugal. Since a high mortality of juveniles of this species was observed in an aquaculture experiment carried out in Ria de Aveiro in 2015/2016, which occurred during a period of intense precipitation and temperature increase, the main objective of the present work is to evaluate the tolerance of this species to these environmental factors. It also intends to evaluate if the gradual or abrupt variation of the salinity causes higher or lower mortality in these juveniles and if the level of mortality is influenced by the condition of the animals. Since salinity correction in aquaculture tanks can be done by the addition of salt, this work also intends to evaluate the toxicity caused by solutions with high saline concentration in these animals. The pullet carpet shell showed a high mortality after 3 days of exposure to salinity  $\leq 15$  psu. Likewise, a very marked mortality was observed in the highest salinities (47.5 and 50 psu) after 3 days of exposure. The sudden decrease in salinity caused a higher mortality rate than the gradual decrease. Individuals also showed a change in behavior when exposed to abrupt changes in salinity ( $\leq 15$  psu and  $\geq 47.5$  psu) through valve closure. The pullet carpet shell showed to be tolerant to water temperatures up to 25°C for the maximum exposure time tested (9 days), but presented a significant mortality increase for 28°C was observed after 48 hours of exposure. The interaction of salinity and temperature in juvenile mortality was also tested, which was significant, being evident that the high temperature increases mortality when the animals are exposed to low salinities. The biochemical response of the enzymes catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD), as well as lipid peroxidation (LPO) were also determined in the juveniles exposed to different salinities and temperatures after 22 days of exposure. The results show that both GST and SOD have an important role in the cellular protection of juveniles and CAT showed to be the best indicator of saline and thermal stress. It was also verified that, despite the induction of antioxidant enzymes in the different salinities and temperatures, the defense mechanisms were insufficient to avoid lipid peroxidation.



# Índice

Índice .....	I
Lista de figuras .....	III
Capítulo 1- Introdução geral .....	1
1.1.    Aquacultura no mundo .....	2
1.1.1.    Aquacultura mundial de bivalves .....	3
1.2.    Aquacultura de <i>Venerupis corrugata</i> em Portugal .....	4
1.3.    Amêijoia-macha: <i>Venerupis corrugata</i> .....	6
1.4.    Importância da toxicologia no contexto da aquacultura .....	8
1.5.    Enquadramento do trabalho.....	9
1.6.    Organização da Dissertação de Mestrado .....	11
1.6.1.    Avaliação do índice de condição .....	11
1.6.2.    Ensaio de salinidade .....	12
1.6.3.    Ensaio de temperatura .....	13
1.6.4.    Ensaio de temperatura e salinidade.....	13
1.6.5.    Stresse oxidativo .....	14
1.7.    Objectivos do trabalho .....	14
Capítulo 2- Material e Métodos .....	16
2.1.    Avaliação do índice de condição .....	17
2.2.    Ensaio de salinidade .....	18
2.2.1.    Proveniência dos animais e aclimação.....	18
2.2.2.    Ensaio com salinidades baixas: desenho experimental .....	19
2.2.3.    Ensaio com salinidades altas: desenho experimental.....	21
2.2.4.    Tratamento estatístico .....	21
2.3.    Ensaio de salinidade com diferentes índices de condição .....	22
2.3.1.    Proveniência dos animais e aclimação.....	22
2.3.2.    Determinação do índice de condição.....	22
2.3.3.    Desenho experimental .....	23
2.4.    Ensaio de temperatura.....	23
2.4.1.    Proveniência dos animais e aclimação.....	23
2.4.2.    Desenho experimental .....	24
2.5.    Ensaio de temperatura com diferentes índices de condição .....	24

2.5.1.	Proveniência dos animais, aclimação e determinação do índice de condição .....	24
2.5.2.	Desenho experimental .....	24
2.6.	Ensaio de temperatura e salinidade com diferentes índices de condição.....	25
2.6.1.	Proveniência dos animais, aclimação e determinação do índice de condição .....	25
2.6.2.	Desenho experimental .....	25
2.6.3.	Tratamento estatístico .....	25
2.7.	Stresse oxidativo .....	26
2.7.1.	Proveniência dos animais e aclimação.....	26
2.7.2.	Desenho experimental .....	26
2.7.3.	Análise bioquímica .....	27
2.7.4.	Tratamento estatístico .....	29
Capítulo 3- Resultados .....		30
3.1.	Avaliação do índice de condição .....	31
3.2.	Ensaio de salinidade .....	34
3.2.1.	Ensaio com salinidades baixas.....	34
3.2.2.	Ensaio com salinidades altas .....	37
3.3.	Ensaio de salinidade com diferentes índices de condição .....	40
3.4.	Ensaio de temperatura.....	43
3.5.	Ensaio de temperatura com diferentes índices de condição .....	44
3.6.	Ensaio de temperatura e salinidade com diferentes índices de condição.....	45
3.7.	Stresse oxidativo .....	48
Capítulo 4- Discussão .....		53
4.1.	Índice de condição .....	54
4.2.	Salinidade .....	55
4.3.	Temperatura.....	59
4.4.	Stresse oxidativo .....	62
Capítulo 5- Conclusão.....		66
Referências Bibliográficas .....		68

## Lista de figuras

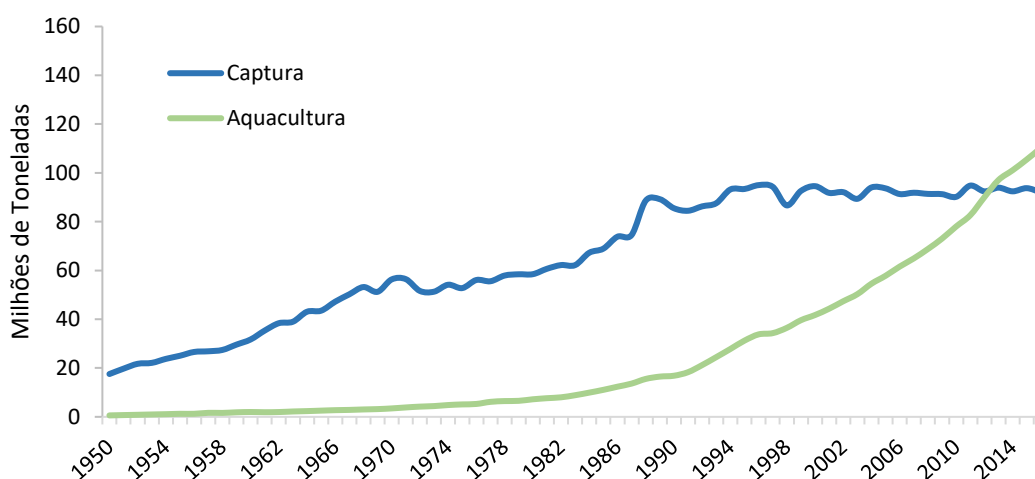
Figura 1-Produção mundial de pescado. FAO, 2018.	2
Figura 2-Produção mundial de bivalves. FAO, 2018.	3
Figura 3- Produção aquícola anual em Portugal. “Amêijoas” incluem apenas as espécies <i>Ruditapes decussatus</i> e <i>Venerupis corrugata</i> . FAO, 2018.	5
Figura 4- Juvenis de <i>Venerupis corrugata</i> .	6
Figura 5- Parte interna de um adulto da espécie <i>Venerupis corrugata</i> .	7
Figura 6- Direção da corrente de água num “Flupsy”.	9
Figura 7- <i>Cardium edule</i> .	11
Figura 8- <i>Mytilus galloprovincialis</i> .	11
Figura 9- <i>Venerupis corrugata</i> .	11
Figura 10- Locais de recolha de bivalves na Ria de Aveiro.	17
Figura 11- Produção laboratorial das microalgas <i>Isochrysis galbana</i> e <i>Skeletonema costatum</i> .	19
Figura 12- Aparato experimental do ensaio com salinidades baixas.	20
Figura 13- Aparato experimental do ensaio com descida de salinidade e subida de temperatura para posterior recolha de indivíduos para stresse oxidativo.	27
Figura 14- Índice de condição de mexilhão <i>Mytilus galloprovincialis</i> recolhido no esporão da Praia da Costa Nova em Janeiro e Maio de 2018.	32
Figura 15- Índice de condição de mexilhão <i>Mytilus galloprovincialis</i> recolhido no Canal de Mira em Janeiro e Maio de 2018.	32
Figura 16- Índice de condição de berbigão <i>Cardium edule</i> recolhido no Canal de Mira em Janeiro e Maio de 2018.	33
Figura 17- Índice de condição de amêijoas-macha <i>Venerupis corrugata</i> recolhida no Tanque da Saltoa em Janeiro e Maio de 2018.	33
Figura 18- Percentagem média de mortalidade de juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a salinidades baixas. Os animais foram expostos directamente (sem transição gradual) a diferentes concentrações salinas após aclimação a 30 psu (“tratamento de choque”).	35
Figura 19- Percentagem média de mortalidade de juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a uma descida gradual de salinidade. G30- 30 psu (controlo); G27,5- Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 27,5 psu; G25- Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 25 psu; G22,5- Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 22,5 psu; G20- Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 20 psu; G17,5- Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 17,5 psu; G15- Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 15 psu; G12,5- Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 12,5 psu; G10- Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 10 psu.	35
Figura 20- Percentagem média de juvenis de <i>V. corrugata</i> com as valvas fechadas quando expostas a diferentes salinidades no início da experiência (T=0h). Diferenças significativas *** $p < 0,001$ em comparação com o controlo.	37
Figura 21- Percentagem média de mortalidade de juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a salinidades ( $\geq 30$ psu) altas. Os animais foram expostos directamente (sem transição gradual) a diferentes concentrações salinas após aclimação a 30 psu (“tratamento de choque”).	38
Figura 22- Percentagem média de mortalidade de juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a uma subida gradual de salinidade. G30- 30 psu (controlo); G32,5- Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 32,5 psu; G35- Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 35 psu; G37,5- Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 37,5 psu; G40- Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 40 psu; G42,5- Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 42,5 psu; G45- Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 45 psu; G47,5- Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 47,5 psu; G50- Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 50 psu.	38

Figura 23- Percentagem média de juvenis de <i>V. corrugata</i> com as valvas fechadas quando expostas a diferentes salinidades no início da experiência (T=0h). Diferenças significativas ** $p<0,01$ ; *** $p<0,001$ em comparação com o controlo.	39
Figura 24- Juvenil de <i>V. corrugata</i> com os sífões trilhados entre as valvas após 48h de exposição à salinidade de 12,5 psu.	40
Figura 25- Percentagem média de mortalidade de juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a diferentes salinidades após duas semanas de aclimação com alimento (A) e sem alimento (NA).	41
Figura 26- Percentagem média de juvenis de <i>V. corrugata</i> com as valvas fechadas expostas às salinidades de 30, 12,5 e 50 psu após aclimação com alimento (representado pela letra "A") e sem alimento (representado pelas letras "NA") no início da experiência (T=0h). Diferenças significativas *** $p<0,001$ em comparação com o respectivo controlo.	42
Figura 27- Percentagem média de mortalidade de juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos diferentes temperaturas.	43
Figura 28- Percentagem média de mortalidade de juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos diferentes temperaturas após duas semanas de aclimação com alimento (representado pela letra "A") e sem alimento (representado pelas letras "NA").	44
Figura 29- Percentagem média de mortalidade de juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos diferentes temperaturas e salinidades após duas semanas de aclimação com alimento (representado pela letra "A") e sem alimento (representado pelas letras "NA").	46
Figura 30- Percentagem média de juvenis de <i>V. corrugata</i> com as valvas fechadas expostas à salinidade de 12,5 psu e temperatura de 16 e 25°C após aclimação com (representado pela letra "A") e sem alimento (representado pelas letras "NA") no início da experiência (T=0h) e após 24h de exposição. Diferenças significativas *** $p<0,001$ em comparação com o respectivo tratamento no instante inicial (0h).	47
Figura 31- Juvenil de <i>V. corrugata</i> com os sífões trilhados entre valvas após 48h de exposição à salinidade de 12,5 psu e temperatura de 16°C.	48
Figura 32- Peroxidação lipídica em juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 16 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p\leq 0,05$ ) entre condições, enquanto que letras iguais não representam diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre condições. Letras minúsculas representam comparações entre salinidades da mesma temperatura, enquanto que letras maiúsculas representam comparações entre temperaturas da mesma salinidade.	49
Figura 33- Actividade da CAT em juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 16 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p\leq 0,05$ ) entre condições, enquanto que letras iguais não representam diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre condições. Letras minúsculas representam comparações entre salinidades da mesma temperatura, enquanto que letras maiúsculas representam comparações entre temperaturas da mesma salinidade.	50
Figura 34- Actividade da GST em juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 16 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p\leq 0,05$ ) entre condições, enquanto que letras iguais não representam diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre condições. Letras minúsculas representam comparações entre salinidades da mesma temperatura, enquanto que letras maiúsculas representam comparações entre temperaturas da mesma salinidade.	51
Figura 35- Actividade da SOD em juvenis de <i>V. corrugata</i> expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 16 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p\leq 0,05$ ) entre condições, enquanto que letras iguais não representam diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre condições. Letras minúsculas representam comparações entre salinidades da mesma temperatura, enquanto que letras maiúsculas representam comparações entre temperaturas da mesma salinidade.	51
Figura 36- Variação sazonal de salinidade num dos tanques de aquacultura da empresa de aquacultura na Ria de Aveiro durante o estágio (4º ano de licenciatura) realizado no ano lectivo de 2015/2016.	55

# Capítulo 1- Introdução geral

## 1.1. Aquacultura no mundo

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) considera que a aquacultura é o sector de produção alimentar com maior crescimento a nível mundial. Desde 1970, este sector tem aumentado exponencialmente, alargando o seu contributo para o fornecimento global de pescado (DGRM, 2017). Em 2013, a aquacultura passou a fornecer mais de metade da produção de pescado mundial para a alimentação humana (Fig. 1) e a FAO estima que este valor aumente para cerca de 62% em 2030 (FAO 2014). Em 2016 a produção aquícola alcançou 110 milhões de toneladas (peso vivo), correspondendo a um valor estimado de 210 mil milhões de euros. Cerca de 92% de toda a produção mundial aquícola foi originária da Ásia, havendo uma clara heterogeneidade geográfica neste sector. A China é o maior produtor mundial em aquacultura, gerando cerca de 20 vezes mais pescado que a Europa, e representa 58% da produção total mundial, seguindo-se a Indonésia com 15% e a Índia com 5% (FAO 2018a).



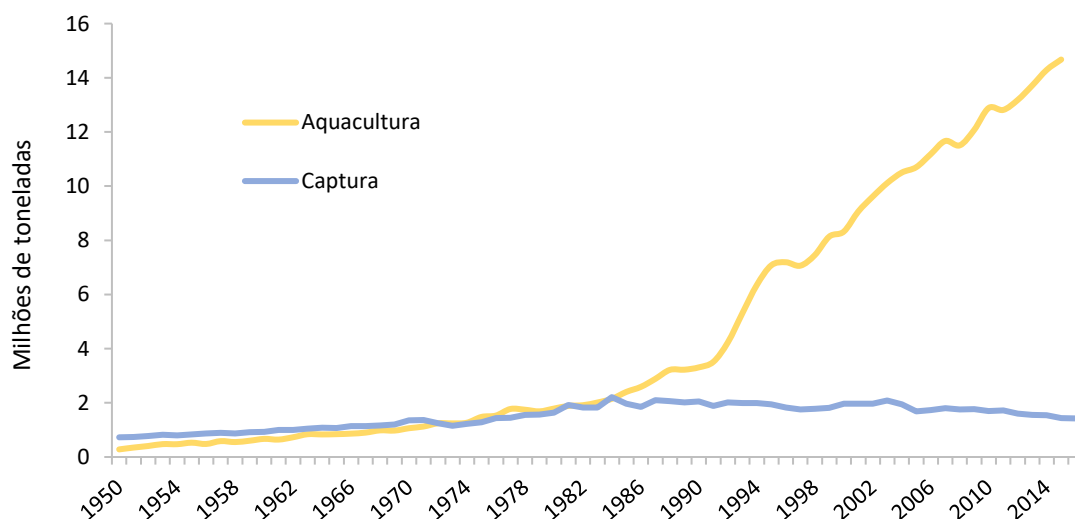
**Figura 1**-Produção mundial de pescado. FAO, 2018.

A Ásia é líder na produção de pescado através da aquacultura. Desde 2008 que a produção em aquacultura neste continente é superior à captura de pescado e, em 2016, a produção em aquacultura representou 67% da produção asiática total. Nos restantes continentes a aquacultura contribui com apenas 15-18% da produção total de pescado (FAO 2018a). Durante a última década, a produção europeia anual de pescado através da aquacultura situou-se nos 2,5 milhões de toneladas anuais. Em 2016, a Europa produziu cerca de 3 milhões de toneladas de pescado, contribuindo apenas com 2,7% do pescado mundial produzido através da aquacultura (FAO 2018a).

Apesar do rápido crescimento do sector da aquacultura no panorama mundial, a Europa tem apresentado um crescimento anual baixo, na ordem dos 3%.

### 1.1.1. Aquacultura mundial de bivalves

A produção em aquacultura de moluscos bivalves tem vindo a aumentar acentuadamente desde 1990 à escala global. Este crescimento permitiu satisfazer a elevada procura do mercado para este grupo de organismos (Pawiro 2010). Os bivalves (ex.: amêijoas, ostras, mexilhões e vieiras) são uma porção importante da produção de pescado mundial representando, actualmente, cerca de 14%. Entre os anos de 2000 e 2016 esta produção apresentou um crescimento anual de 4% (Fig. 2), sendo que em 2016, as ostras representaram 37% da produção total de bivalves, seguidas das amêijoas com 36%, das vieiras e dos mexilhões com 14% e 13%, respectivamente. Os dados mais recentes mostram que a China é o principal produtor mundial de bivalves, produzindo 13 milhões de toneladas anuais, o que representa 85% da produção global. Na Europa, a produção anual de bivalves situa-se nas 600 mil ton, sendo a Espanha, a França e a Itália os principais produtores (FAO 2018a). Actualmente, Portugal produz cerca de 5 mil toneladas anuais de bivalves através da aquacultura, sendo o 10º país com maior contribuição na Europa.



**Figura 2**-Produção mundial de bivalves. FAO, 2018.

## 1.2. Aquacultura de *Venerupis corrugata* em Portugal

Os estuários são zonas de transição entre os rios e o oceano que albergam um número considerável de espécies com valor comercial, e são áreas muito importantes para desova e "nursery" de várias espécies marinhas com interesse para a pesca (Mohammed & Scholz 2017). São locais que apresentam elevada produtividade biológica e grande importância ecológica e económica (Verdelhos et al. 2015). Estão sujeitos a variações diárias e sazonais de diversos factores ambientais, nomeadamente, salinidade, temperatura e pH, sendo o gradiente longitudinal de salinidade um dos factores preponderantes que influencia a distribuição espacial das espécies que aí habitam (Mohammed & Scholz 2017). Outras características, como o tipo de sedimento, quantidade de nutrientes e profundidade, também afectam a distribuição das espécies ao longo do estuário. Os sistemas estuarinos são áreas propícias ao desenvolvimento da aquacultura por serem zonas abrigadas (em comparação com a linha de costa exposta ao mar), que facilitam a implantação de infraestruturas para a prática da aquacultura, mas sendo, ao mesmo tempo, bem abastecidas com água proveniente do mar ou do rio (dependendo da localização). Neste caso, há, no entanto, o inconveniente da qualidade da água poder apresentar variações acentuadas ao longo do ano devido à diferente proporção da mistura de água doce e marinha que varia em função da amplitude da maré e da precipitação, o que, em situações extremas, pode causar stresse aos animais que estejam sob cultura extensiva ou semi-intensiva.

Esta actividade é bastante antiga no país, tendo sido iniciada por salicultores, que mantinham aprisionados nos reservatórios de água os peixes que entravam com as marés, e por moluscicultores, que faziam a produção extensiva de bivalves em bancos intermareais (Bernardino 2000). A aquacultura extensiva de bivalves constituiu uma actividade tradicional em Portugal e as principais áreas de produção nos meados do século passado eram a Ria Formosa, com a produção de amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*), e os estuários do Tejo e do Sado, com a produção de ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*), ambas assumindo um importante papel na sustentabilidade das populações locais (Bernardino 2000). Entre 1950 e 1960, a ostra produzida teve grande importância comercial e esta foi maioritariamente exportada para França. A partir da década de 60, a produção da ostra portuguesa começou a diminuir dada a ocorrência de doenças, deformações nas conchas e mortalidade consequente da poluição industrial, contribuindo para a redução do valor comercial da espécie (Pessoa & Oliveira 2006).

A diminuição da actividade salícola em Portugal, que ocorreu a partir de 1970, levou ao abandono dos tanques de produção de sal. Como forma de reaproveitamento destas estruturas, começaram a ser cultivadas em regime de produção semi-intensivo algumas espécies marinhas,

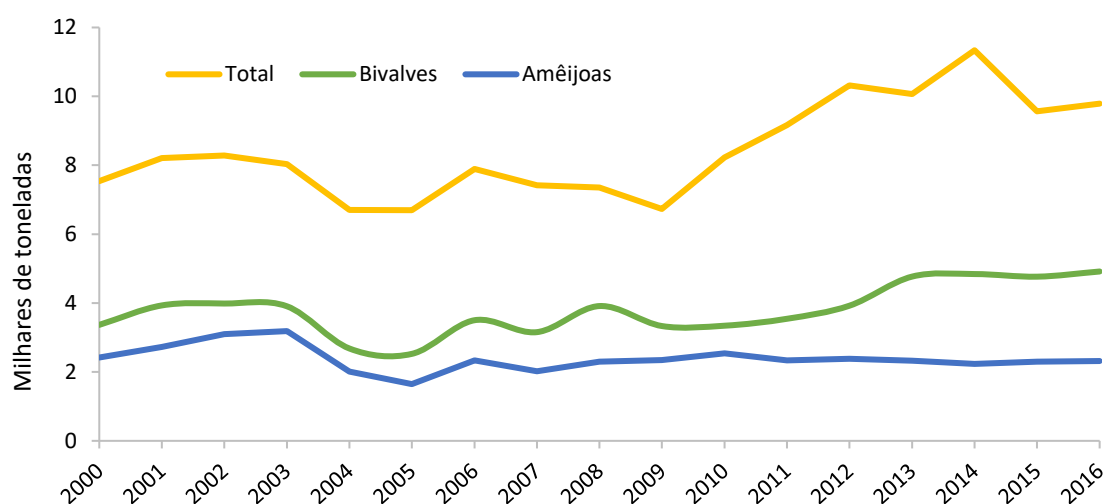


com predominância do robalo e da dourada. O rápido crescimento do sector da aquacultura em Portugal deveu-se essencialmente aos incentivos financeiros da CEE (Comunidade Económica Europeia), após a adesão de Portugal à CEE em 1986. O aumento da produção neste sector esteve também associado à modernização dos equipamentos e infraestruturas e a uma maior disponibilidade de juvenis, com o surgimento de um maior número de maternidades.

Em 2016, a produção de aquacultura em Portugal foi de 9787 toneladas (Fig. 3) e gerou uma receita de, aproximadamente, 55 milhões de euros. A produção em águas salobras e marinhas foi a mais relevante, correspondendo a 93% da produção total. Os moluscos bivalves representaram 50% da produção nacional, com 4916 toneladas no valor de 27 milhões de euros, mantendo-se as amêijoas como as espécies mais relevantes (FAO 2018a).

A amêijoa-macha é uma das espécies de bivalves mais comercializada para consumo em Portugal (Velez et al. 2014). Esta espécie é produzida no estuário do Rio Lima, na Ria de Aveiro, estuário do Mondego, lagoa de Óbidos, estuário do Tejo e lagoa de Albufeira (IPMA 2017). Na Ria de Aveiro, a amêijoa-macha é sobretudo capturada em bancos naturais com auxílio de um ancinho de cabo longo, através de arrasto de fundo ou à mão. No final do século passado, as dimensões das capturas diárias por pescador variavam entre os 3 a 6 kg (Maia 2006), sendo que actualmente o limite diário de captura desta espécie é 2 kg (DGRM 2018).

O tamanho mínimo de desembarque da amêijoa-macha é de 38 mm, excepto se a captura for efectuada em águas interiores não marítimas, como a Ria de Aveiro, onde esse valor é de 30 mm (Portaria n.º 82/2011, de 22 de Fevereiro). De uma forma geral, o tamanho mínimo de captura



**Figura 3-** Produção aquícola anual em Portugal. “Amêijoas” incluem apenas as espécies *Ruditapes decussatus* e *Venerupis corrugata*. FAO, 2018.

apresenta grande importância para gerir o *stock* de biomassa desovante de espécies exploradas, uma vez que a captura de animais muito pequenos pode impedir a sua primeira reprodução.

Devido ao seu valor comercial, a população natural de amêijoa-macha da Ria de Aveiro tem vindo a diminuir ao longo dos últimos anos em consequência de uma intensa captura, muitas vezes pela prática de pesca submarina (Maia, Sobral & Gaspar 2006), ilegal em águas interiores não marítimas (Portaria n.º 563/90, de 19 de Julho).

### 1.3. Amêijoa-macha: *Venerupis corrugata*

*Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791) é um molusco bivalve da família *Veneridae*, vulgarmente conhecida em Portugal como amêijoa-macha ou amêijoa-judia. A sua concha é sólida e apresenta uma forma oval, equivalva e inequilátera. O bordo posterior é quase horizontal. Pode apresentar uma vasta gama de tons, desde branca, bege, amarela, castanha ou roxa. Ornamentações como manchas, bandas radiais, linhas em zig-zague ou flâmulas podem aparecer muitas vezes na zona posterior e apresentar uma coloração mais escura (Macedo et al. 1999; Hernández et al. 2011) (Fig. 4). O interior da valva pode ser branco ou amarelo, podendo apresentar uma mancha roxa no bordo posterior (Fig. 5). Os sífões estão unidos ao longo de todo o comprimento do animal, excepto na zona terminal (FAO 2018) e, tal como a concha, a zona terminal dos sífões desta espécie pode variar de tonalidade, desde o branco, a castanho ou alaranjado (Fig. 4). Apresenta anéis de crescimento bem delineados e possui estrias longitudinais mais marcadas e estrias radiais pouco pronunciadas, podendo atingir os 50 mm de comprimento (Macedo et al. 1999).

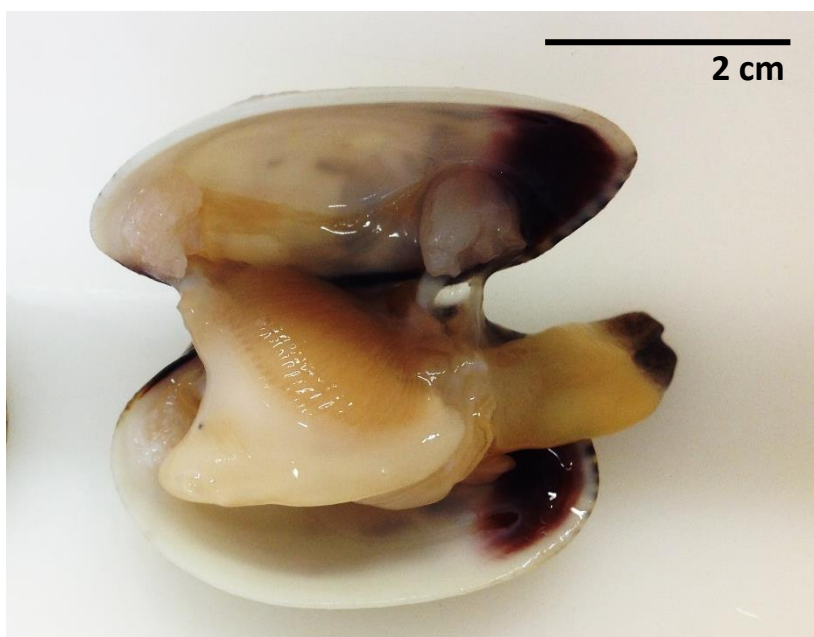


**Figura 4-** Juvenis de *Venerupis corrugata*.

Apresenta um desempenho de crescimento óptimo a uma temperatura de 20 °C (Albentosa et al. 1994) e com uma variação de pH de 7.50 a 8.00 (Calabrese & Davis 1966; Ringwood & Keppler 2002).

Ambos os géneros desta espécie atingem a maturação sexual com comprimento total de 22 mm (Maia, Sobral, Gaspar, et al. 2006) e o período de reprodução estende-se desde a primavera até ao verão, dependendo das condições ambientais, nomeadamente temperatura e disponibilidade de alimento (Joaquim et al. 2011). Durante este período, os gâmetas são lançados para a coluna de água onde ocorre a fertilização. Inicia-se uma fase larvar, onde há o desenvolvimento dos ovos em larvas trocóforas e, posteriormente, em larvas D-velígeras (Dame 1996; Aranda-Burgos et al. 2014). Esta fase é planctónica e tem uma duração aproximada de 30 dias (Quayle 1951). É seguida de metamorfose, caracterizada pela perda do velum, pelo funcionamento da glândula bissal e a formação da concha. Após esta, há o assentamento e a amêijoia passa a adquirir uma vida bentónica (Dame 1996; Quayle 1951).

Vive enterrada no sedimento até cerca de 5 cm da superfície, em fundos de lodo, areia ou cascalho e desde a zona entre marés até 40 m abaixo do nível médio da água do mar. Ocorre em zonas intertidais e subtidais dos estuários e encontra-se distribuída ao longo da costa Atlântica, desde a Noruega até a África do Sul, incluindo o Mar Báltico, o Mar Mediterrâneo e as Canárias (Macedo et al. 1999; Hernández et al. 2011). A amêijoia-macha é um bivalve filtrador e alimenta-se de plâncton: bactérias, detritos, matéria orgânica dissolvida e, sobretudo, de fitoplâncton, sendo que a sua dieta alimentar pode variar dependendo do habitat que ocupe. Têm a capacidade de



**Figura 5-** Parte interna de um adulto da espécie *Verenupis corrugata*.

filtrar um elevado volume de água que, aliado com a grande superfície disponível nas brânquias, permite uma captura mais fácil do alimento (Jørgensen 1990).

O fluxo de água entra pelo sifão inalante, percorre as brânquias, que colectam as partículas através dos cílios que cobrem toda a superfície, e dirige-se para o exterior através do sifão exalante. Ao serem colectadas, as partículas são ligadas a uma substância mucosa que é transportada através dos cílios até à boca do organismo. A rejeição de partículas de alimento resulta numa massa designada pseudofeces e esta é expelida para o exterior através movimentos valvares vigorosos (Helm & Bourne 2004).

#### **1.4. Importância da toxicologia no contexto da aquacultura**

Toxicologia é definida por Klaassen (2008) como o estudo dos efeitos adversos dos xenobióticos nos organismos. Segundo Stellman (1998), toxicologia é a identificação e quantificação de consequências adversas associadas a exposições a substâncias químicas, agentes físicos e outras condições. Apesar do termo toxicologia apresentar diversas definições, a mais adequada no contexto da aquacultura é estabelecida pela Sociedade de Toxicologia, que define toxicologia como o estudo dos efeitos adversos provocados por agentes químicos, físicos ou biológicos em organismos vivos e no ecossistema, incluindo o estudo da prevenção de tais efeitos adversos (Woolley 2008). Para além desta definição se referir a agentes de diferentes naturezas e não se cingir apenas a produtos químicos ou xenobióticos, uma vez que os organismos em produção podem estar expostos também a agentes físicos (ex.: ruído, iluminação) e biológicos (ex.: toxinas), menciona também um aspecto igualmente importante para o desenvolvimento da produção aquícola: prevenir os efeitos destes agentes.

Assim, a toxicologia surge no contexto da aquacultura como uma ferramenta fundamental para definir a tolerância das espécies produzidas aos agentes a que estão expostos por forma a minimizar a mortalidade na cultura e potencializar o crescimento dos animais. Um exemplo típico é a amónia ( $\text{NH}_4^+$ ) e amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), produzidos naturalmente pelos organismos como produtos de excreção, que podem atingir rapidamente concentrações letais para os indivíduos nos tanques de cultura caso a água não seja devidamente renovada.

Quando se trata de aquacultura em sistemas estuarinos, a salinidade da água torna-se outro aspecto relevante, uma vez que neste ambiente este factor pode apresentar variações ao longo do ano em função da amplitude da maré e da precipitação, podendo causar stresse aos animais que estejam sob cultura. Devido às alterações climáticas, a ocorrência de fenómenos

extremos de precipitação pode provocar diminuições drásticas da salinidade da água, com graves consequências para a aquacultura. Uma prática utilizada para evitar que a salinidade diminua para valores que coloquem em risco a sobrevivência dos animais em cultura é a adição de sal nos tanques de cultivo. Na produção de bivalves, este processo de adição de sal apresenta elevado risco para os animais uma vez que a maioria, como o caso da amêijoia-macha, são osmoconformantes. Desta forma, mantêm a concentração osmótica dos fluídos extracelulares semelhante à do meio envolvente, ou seja, quando expostos a um meio hipersalino, vai ocorrer um movimento de água do interior das células para o meio e, consequentemente, plasmólise e danos metabólicos nas células. Assim, em aquacultura, torna-se essencial avaliar a toxicidade associada a concentrações baixas e elevadas de sal na água para evitar elevadas mortalidades dos organismos e o colapso da produção. Esta dissertação constitui, portanto, um exemplo de como a toxicologia pode ser aplicada à aquacultura, focando essencialmente a toxicidade provocada por valores extremos de salinidade da água na amêijoia-macha, em função da temperatura e estado nutricional dos animais.

### 1.5. Enquadramento do trabalho

O trabalho desenvolvido durante este mestrado surge no seguimento do estágio (4º ano de licenciatura) realizado numa empresa de aquacultura na Ria de Aveiro no ano lectivo de 2015/2016. Esta empresa dedica-se à pré-engorda e engorda de amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) e de amêijoia-macha (*Verenupis corrugata*) através de um regime semi-intensivo em que é produzido fitoplâncton para alimentação suplementar destes bivalves (Edwards & Demaine 1998). Este tipo de regime de produção é inovador relativamente ao cultivo de bivalves à escala global, onde o regime mais utilizado para a pré-engorda e engorda é o extensivo (FAO 2004).

Nessa empresa a pré-engorda dos juvenis de amêijoia foi efectuada num Floating UPweller SYstem ou “Flupsy”, que é uma estrutura que suporta uma série de recipientes (silos) ligados exteriormente a um canal central estanque através de um tubo. A água é forçada a sair do canal central através do uso de uma roda de pás (“paddlewheel”) e é reposta no canal através da corrente ascendente de água



Figura 6- Direcção da corrente de água num “Flupsy”.

("upwelling") que passa através dos silos que contêm as sementes de amêijoia (Fig. 6). A rotação do "paddlewheel" é garantida por um motor eléctrico. Este sistema foi desenhado pela empresa, em parceria com a Universidade de Aveiro, e tem sido apontado como o método mais eficiente para pré-engorda de sementes de bivalves ao ar livre (Jones et al. 1993; Flimlin 2000).

Este sistema, além de aumentar probabilidade de sobrevivência dos animais, também promove um crescimento mais rápido e uniforme, uma vez que providencia às sementes um suplemento constante de nutrientes e oxigénio através do constante fluxo de água (Chessa et al. 2013; Dawicki 2009). O acesso às sementes pelo aquacultor é facilitado por dois passadiços localizados junto aos silos, tornando as amostragens e a manutenção mais simples.

Durante o estágio observou-se nos silos do "Flupsy", entre Abril e Maio de 2016, uma elevada taxa de mortalidade de amêijoia-macha, na ordem dos 50%. Colocou-se a hipótese de que as principais causas de mortalidade tivessem sido a redução da salinidade, devido à intensa precipitação verificada para esses meses, onde foram registados valores abaixo dos 25 psu durante vários dias (com um valor mínimo registado de 21 psu a 18.04.2016, não descartando a hipótese de poderem ter ocorrido valores inferiores não registados), concomitante com uma rápida subida de temperatura, de 13,4°C em 11.04.2016 para 22,1°C em 04.05.2016. Admitiu-se, também, que o baixo índice de condição que os animais apresentavam nessa altura pudesse ter contribuído para a mortalidade observada, visto que aumentaria a sua sensibilidade ao stresse salino e térmico. Dada a escassez de informação disponível na literatura sobre a susceptibilidade da espécie a estes factores, estas hipóteses viriam a ser testadas experimentalmente na presente dissertação de mestrado.

Uma das técnicas que os aquacultores têm ao seu dispor para evitar o decréscimo excessivo da salinidade da água é a adição de sal nos tanques de cultivo, uma prática aplicada pontualmente em situações de emergência. Assim, conhecendo-se os limites de tolerância da espécie, a adição de sal nos tanques pode ser iniciada quando a salinidade diminui perigosamente para valores que coloquem em risco a sobrevivência dos animais. No entanto, o processo de adição de sal apresenta, por si só, risco dos animais poderem ficar temporariamente expostos a valores superiores aos da água do mar, sendo, por essa razão, também importante avaliar a toxicidade associada a concentrações de sal na água superiores aos valores normalmente encontrados no ambiente natural. Assim, para esta dissertação, considerou-se relevante determinar os intervalos de tolerância da amêijoia-macha a salinidades baixas e altas e a temperaturas altas da água, para diferentes índices de condição dos animais, de forma a melhorar a metodologia do cultivo desta espécie.



## 1.6. Organização da Dissertação de Mestrado

### 1.6.1. Avaliação do índice de condição

Quando os animais chegam da maternidade ao local da pré-engorda o índice de condição (IC) é avaliado, no entanto este valor muitas vezes não apresenta um significado lógico e houve a necessidade de ter uma base para interpretar melhor o valor do IC consoante a época do ano e o tamanho do animal.

Sendo o IC um indicador importante do estado de saúde dos animais, e podendo influenciar a resposta dos animais a um stresse, considerou-se relevante neste trabalho compreender melhor como o IC pode variar em função do local, da época do ano e do tamanho corporal, em diferentes espécies de bivalves. Para isso, comparou-se o IC de duas espécies de bivalves comuns da região de Aveiro - berbigão e mexilhão - com a espécie alvo do presente estudo - amêijoa-macha -, a qual foi mantida em cestos suspensos no ambiente natural (Fig. 7, 8 e 9). Com base nesta informação, torna-se mais fácil interpretar este parâmetro quando mais adiante, nesta dissertação, se determina o IC em animais de um determinado tamanho provenientes da maternidade e sujeitos a diferentes condições experimentais (ex.: com alimentação e sem alimentação).

**Berbigão**  
*Cardium edule*



**Figura 7-** *Cardium edule*.

**Mexilhão**  
*Mytilus galloprovincialis*



**Figura 8-** *Mytilus galloprovincialis*.

**Amêijoa-macha**  
*Venerupis corrugata*



**Figura 9-** *Venerupis corrugata*.

Para isso, o IC foi determinado em duas épocas do ano: início do inverno (Janeiro), quando a água atinge a temperatura mais baixa e há menos alimento, e meados da primavera (Maio), quando surge um aumento de temperatura, um bloom de fitoplâncton e decorre a época de reprodução destas espécies.

### 1.6.2. Ensaios de salinidade

Na Ria de Aveiro, a amêijoa-macha está sujeita a variações diárias e sazonais de salinidade devido ao ciclo de marés e à estação das chuvas, respectivamente. Este fenómeno verificou-se durante a pré-engorda da espécie na empresa (aquando da realização do estágio de licenciatura), onde de Janeiro a Maio de 2016 foram registados valores de salinidade inferiores a 30 psu. Durante esse período registou-se uma elevada mortalidade e, por essa razão, pretende-se testar agora a hipótese nula de que salinidades  $\leq 30$  psu não causam mortalidade nesta espécie. Para testar esta hipótese realizou-se um ensaio com duração de 9 dias (216h), no qual juvenis de amêijoa-macha foram expostos a salinidades entre 30 e 10 psu através de um tratamento de choque e de um tratamento gradual (descritos no sub-capítulo 2.2.2). Este ensaio será designado doravante por “ensaio com salinidades baixas” e os resultados estão apresentados no sub-capítulo 3.2.1.

Se a diminuição da salinidade durante a estação das chuvas causar mortalidade nesta espécie, a única medida que o aquacultor pode aplicar para contrariar este fenómeno é adicionar sal aos tanques de aquacultura. Para isso, esse trabalho avalia também a mortalidade provocada pela subida momentânea da salinidade junto à comporta de entrada dos tanques, local por onde é feita a admissão da água salinizada. De facto, a adição de sal é feita no canal de admissão de água (antes desta entrar nos tanques de cultivo), e antes de se dissolver completamente nos tanques pode afectar as amêijoas situadas junto à comporta por onde entra. Neste contexto, decidiu-se testar a hipótese nula de que salinidades altas não provocam mortalidade na amêijoa-macha. Para testar esta hipótese realizou-se um ensaio com duração de 6 dias (144h), no qual juvenis de amêijoa-macha foram expostos a salinidades entre 30 e 50 psu através de um tratamento de choque e de um tratamento gradual (descritos no sub-capítulo 2.2.2). Este ensaio será designado doravante por “ensaio com salinidades altas” e os resultados estão apresentados no sub-capítulo 3.2.2.

Admite-se que o baixo índice de condição poderá ter contribuído para a mortalidade observada nos silos em Abril e Maio de 2016, no entanto desconhece-se a influência que este factor tem sobre a amêijoa-macha quando esta está exposta a salinidades baixas e altas. Neste contexto decidiu-se testar a hipótese nula de que diferentes índices de condição não provocam mortalidade na amêijoa-macha quando exposta a salinidades baixas e altas. Para testar esta hipótese realizou-se um ensaio com duração de 10 dias (240h), no qual juvenis de amêijoa-macha foram sujeitos a diferentes condições experimentais: aclimação com alimentação, simulando uma época com bastante disponibilidade de alimento por forma a aumentar o IC dos animais, e aclimação sem alimentação, simulando uma época sem disponibilidade de alimento por forma a diminuir o IC dos



animais. Posteriormente foram expostos a salinidades de 12,5, 30 e 50 psu através de um tratamento de choque (descrito no sub-capítulo 2.2.2). Este ensaio será designado doravante por “ensaio de salinidades com diferentes índices de condição” e os resultados estão apresentados no sub-capítulo 3.3.

#### **1.6.3. Ensaio de temperatura**

Durante a pré-engorda da amêijoia-macha (aquando da realização do estágio de licenciatura) também se verificou um rápido aumento na temperatura da água do tanque de cultivo, com uma subida de 13,4°C para 22,1°C de meados do mês de Abril ao início do mês de Maio de 2016. Sendo que durante esse período se registou uma elevada mortalidade, pretende-se testar a hipótese nula de que temperaturas  $\geq 16^{\circ}\text{C}$  não causam mortalidade nesta espécie. Para testar esta hipótese realizou-se um ensaio com duração de 9 dias (216h), no qual juvenis de amêijoia-macha foram expostos a temperaturas entre 16°C e 28°C através de um tratamento de choque. Este ensaio será designado doravante por “ensaio com temperaturas” e os resultados estão apresentados no sub-capítulo 3.4.

Desconhece-se, novamente, a influência que o índice de condição tem sobre a amêijoia-macha quando esta está exposta a temperaturas altas e admitindo que este factor poderá ter contribuído para a mortalidade observada nos silos em Abril e Maio de 2016, decidiu-se testar a hipótese nula de que diferentes índices de condição não provocam mortalidade na amêijoia-macha quando exposta a temperaturas altas. Para testar esta hipótese realizou-se um ensaio com duração de 7 dias (168h), no qual juvenis de amêijoia-macha, sujeitos a diferentes condições experimentais (ex.: com alimentação e sem alimentação), foram expostos a temperaturas de 16, 25 e 28°C. Este ensaio será designado doravante por “ensaio de temperaturas com diferentes índices de condição” e os resultados estão apresentados no sub-capítulo 3.5.

#### **1.6.4. Ensaio de temperatura e salinidade**

As variações diárias e sazonais de salinidade e temperatura são fenómenos naturais que se verificaram durante a pré-engorda da amêijoia-macha nas instalações da empresa de aquacultura (aquando da realização do estágio de licenciatura). Colocou-se a hipótese de que essas variações, nomeadamente a descida da salinidade até valores registados de 21 psu associada à subida de temperatura até valores registados de 22°C entre os meses de Abril e Maio de 2016, podem ter sido uma das principais causas para justificar a mortalidade na ordem dos 50% que se verificou nos silos do “Flupsy” onde os animais estavam a crescer. Da mesma forma, colocou-se a hipótese de

que o baixo índice de condição que os juvenis apresentavam nesse momento pudesse ter contribuído para a mortalidade observada, uma vez que poderia aumentar a sensibilidade dos juvenis ao stresse salino e térmico. Decidiu-se então testar a hipótese nula de que diferentes índices de condição não provocam mortalidade na amêijoa-macha quando exposta a salinidades baixas e temperaturas altas. Para testar esta hipótese realizou-se um ensaio com duração de 9 dias (216h), no qual juvenis de amêijoa-macha, sujeitos a diferentes condições experimentais (ex.: com alimentação e sem alimentação), foram expostos a salinidades de 30 e 12,5 psu e a temperaturas de 16 e 25°C. Este ensaio será designado doravante por “ensaio de temperatura e salinidade com diferentes índices de condição” e os resultados estão apresentados no sub-capítulo 3.6.

#### **1.6.5. Stresse oxidativo**

As respostas bioquímicas, nomeadamente a nível das enzimas antioxidantes, são ferramentas importantes pois fornecem informações que permitem avaliar de que forma os juvenis de *V. corrugata* reagem quando são expostos a salinidades e temperaturas extremas. Decidiu-se então testar a hipótese nula de que a exposição a salinidades baixas e temperaturas altas não provoca stresse oxidativo nas células da amêijoa-macha. Para testar esta hipótese realizou-se um ensaio no qual juvenis de amêijoa-macha foram expostos a salinidades entre 30 e 15 psu e a temperaturas entre 16 e 25°C, no qual, ao fim de 16 dias de exposição, foram recolhidos indivíduos para a análise das enzimas antioxidantes. Este trabalho será designado doravante por “stresse oxidativo” e os resultados estão apresentados no sub-capítulo 3.7.

### **1.7. Objectivos do trabalho**

Neste contexto, descrevem-se a seguir os objectivos da presente dissertação de mestrado:

- Compreender que factores podem influenciar o valor do índice de condição dos bivalves em condições naturais;
- Testar o efeito de concentrações salinas baixas na sobrevivência de juvenis de amêijoa-macha para verificar se a mortalidade observada em Abril de 2016 na empresa de aquacultura foi influenciada por este factor;
- Testar o efeito de concentrações salinas altas na sobrevivência de juvenis de amêijoa-macha para perceber se a adição de sal nos tanques de cultivo é uma prática viável para corrigir o abaixamento da salinidade da água;

- Testar o efeito de concentrações salinas baixas e altas na sobrevivência de juvenis de amêijoia-macha com diferentes índices de condição para verificar se a mortalidade observada em Abril de 2016 na empresa de aquacultura foi influenciada pela condição dos animais;
- Testar o efeito de diferentes temperaturas na sobrevivência de juvenis de amêijoia-macha, de acordo com os valores registados durante o mês de Abril de 2016 na empresa de aquacultura, por forma a conhecer os limites de tolerância térmica de juvenis de amêijoia-macha;
- Testar o efeito de diferentes temperaturas na sobrevivência de juvenis de amêijoia-macha com diferentes índices de condição para verificar se a mortalidade observada em Abril de 2016 na empresa de aquacultura foi influenciada por este factor;
- Testar o efeito conjunto de salinidades e temperaturas na sobrevivência de juvenis de amêijoia-macha com índices de condição diferentes para perceber se o índice de condição dos indivíduos influencia o seu desempenho perante a interacção de stresse salino e térmico;
- Compreender se a exposição a salinidades baixas e temperaturas altas pode provocar stresse oxidativo na amêijoia-macha.

## Capítulo 2- Material e Métodos

## 2.1. Avaliação do índice de condição

Foi calculado o IC para indivíduos da espécie *Cardium edule*, *Mytilus galloprovincialis* e *Venerupis corrugata* em duas épocas do ano: início do inverno (Janeiro) e final da primavera (Maio). Os mexilhões foram recolhidos em dois locais distintos da região de Aveiro, um localizado no esporão da Praia da Costa Nova Sul (40°60'84.83"N; 08°75'66.61"O) (Fig. 10, ponto A) e o outro localizado no Canal de Mira, no interior da Ria de Aveiro (40°64'26.72"N; 08°73'53.11"O) (Fig. 10, ponto B).



**Figura 10-** Locais de recolha de bivalves na Ria de Aveiro.

Os berbigões também foram recolhidos no Canal de Mira (Fig. 10, ponto B) (40°64'24.18"N; 08°73'50.44"O). As amêijoas, provenientes da maternidade holandesa Hatchery Roem Van Yerseke, foram deixadas a crescer em cestos suspensos num tanque de esteiro da Saltoa (situado em Ílhavo, com profundidade média: 1 m, área do tanque: 28 mil  $m^2$  e sem comportas, devorante designado por "Tanque da Saltoa") (Fig. 10, ponto C) (40°61'68.95"N; 08°67'33.95"O). Este tanque é abastecido naturalmente pela água do Canal de Ílhavo (Ria de Aveiro), de acordo com o regime de marés, em virtude de não existirem comportas de entrada e saída de água. Aquando a experiência, as amêijoas foram recolhidas dos cestos do Tanque da Saltoa.

Os animais foram transportados para o Laboratório de Ecologia Marinha e Estuarina (LEME) e procedeu-se à sua pesagem individual, com o auxílio de uma balança de precisão (Balance analytical A&D Instruments, GR-200-EC, resolução de 0,1 mg), e à sua medição individual, com o auxílio de uma craveira digital (resolução de 0,05 mm). De seguida, separou-se o tecido da concha de cada indivíduo<sup>1</sup>, os quais foram colocados a secar na estufa a 60°C durante um período de 141h. Findo este tempo, efectuou-se uma nova pesagem, após arrefecimento em exsiccador. O IC foi calculado para as três espécies de acordo com Walne (1976) através da fórmula:

$$IC(\%) = \frac{\text{peso seco dos tecidos}}{\text{peso seco da concha}} \times 100$$

Os dados foram analisados com o auxílio do programa estatístico SPSS Statistics 25. Realizaram-se regressões lineares para comparar a relação entre o comprimento dos indivíduos e o seu índice de condição em diferentes épocas do ano. Foram também efectuados testes-t para comparar a relação entre o índice de condição dos indivíduos e os diferentes locais.

## **2.2. Ensaaios de salinidade**

### **2.2.1. Proveniência dos animais e aclimação**

Os juvenis de *V. corrugata* utilizados neste estudo foram comprados à maternidade holandesa, Hatchery Roem Van Yerseke e foram mantidos no Tanque da Saltoa até ao início da experiência. Após este período, foram transportadas para o Laboratório de Ecologia Marinha e Estuarina (LEME) no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Os juvenis foram mantidos num aquário com 15L de água, a 30±1 psu e 16±1°C, com arejamento constante e renovação diária de 50% da água durante 7 dias. Durante este período de aclimação, as sementes foram alimentadas diariamente com as microalgas *Isochrysis galbana* e *Skeletonema costatum* numa razão de 30 cél/μL de *I. galbana* e 30 cél/μL de *S. costatum*. Toda a água salgada usada foi feita artificialmente. A água artificial utilizada na aclimação obteve-se pela dissolução de sal sintético (Ocean Fish, Prodac International, Italy) em água doce filtrada proveniente da rede pública, deixada previamente a arejar durante 24h.

---

<sup>1</sup> Por apresentarem um peso baixo, as conchas e tecidos de juvenis com comprimento de concha ≤10 mm foram pesados em grupos de 3 indivíduos.

As microalgas *I. galbana* e *S. costatum* foram produzidas e mantidas em laboratório sob condições constantes de arejamento, de temperatura ( $16\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (16h luz/8h de escuridão) (Fig. 11). Duas vezes por semana procedia-se à desdobragem das microalgas por forma a garantir um constante crescimento exponencial das mesmas. Para isso, um frasco de vidro de 500mL era enchido com 200mL água salgada a 30 psu, previamente feita com sal sintético, e com 400μL de lixívia e era deixado a actuar durante 24h. Após esse período, 600μL de tiosulfato eram adicionados ao frasco por forma a inactivar a lixívia e este era colocado em forte arejamento durante duas horas. Seguidamente 200μL de uma das espécies de microalgas eram adicionados ao frasco, juntamente com 400μL de meio de cultura e, no caso da *S. costatum*, com mais 400μL de uma solução de silicato.



**Figura 11-** Produção laboratorial das microalgas *Isochrysis galbana* e *Skeletonema costatum*.

### **2.2.2. Ensaio com salinidades baixas: desenho experimental**

Para os ensaios experimentais utilizou-se água doce proveniente da rede pública após ter sido sujeita a osmose inversa, na qual se dissolveu sal sintético (Ocean Fish, Prodac International, Italy) de acordo com as concentrações pretendidas. Foram realizadas medições regulares da salinidade com o auxílio de um refractómetro portátil (Zuzi model C-1).

Foi realizado um ensaio com duração de 9 dias (216h) para determinar os efeitos de salinidades baixas na sobrevivência de juvenis de *V. corrugata* com o objectivo de determinar o limite de tolerância salino inferior. Procedeu-se à medição média do comprimento da concha dos



juvenis e determinou-se o seu índice de condição médio (comprimento da concha  $7,13 \pm 0,78$  mm; IC: 11,0%). Por forma a expor os animais às salinidades observadas na aquacultura durante Abril e Maio de 2016 foram seleccionadas cinco concentrações salinas entre 30 e 20 psu, inclusive, e foram ainda seleccionadas quatro concentrações salinas abaixo dos 20 psu, uma vez que a Ria de Aveiro pode apresentar valores de salinidade mais baixos e torna-se importante perceber de que forma estes influenciam o desempenho desta espécie. Assim, um total de nove salinidades foram seleccionadas: 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 27,5 e 30 psu (controlo). Foram realizados dois tipos de exposições aqui designados por “tratamento de choque” e “tratamento gradual”.

No tratamento gradual, a salinidade descendeu 2,5 psu a cada 12h até atingir a concentração definida, após a qual foram realizadas mudanças de água com salinidade constante a cada 12h até ao final do ensaio. Esta situação representa as condições que normalmente se observam nos tanques de cultivo, uma vez que a renovação da água dos tanques com água proveniente da Ria se situa na ordem dos 30% por dia, ou seja, existe geralmente uma variação gradual da salinidade. No tratamento de choque, as sementes foram colocadas directamente na concentração definida e a água foi trocada a cada 24h. Esta situação raramente se observa nos tanques de cultivo, mas pode eventualmente acontecer quando ocorrem inundações.

Foram realizadas 3 réplicas da experiência -para cada concentração- cada uma composta por 30 indivíduos. Cada réplica foi mantida num frasco de vidro com capacidade para 0,8L, no qual se colocou 0,65L de água com arejamento constante, a uma temperatura de  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16h luz/8h de escuridão (Fig. 12).



**Figura 12-** Aparato experimental do ensaio com salinidades baixas.



A temperatura, o pH ( $7,8 \pm 0,2$ ) e a amónia (0mg/L) foram medidos regularmente através da sonda de temperatura e pH (WTW Multi 3420 SET C) e do teste de amónia/amoníaco da marca Sera, respectivamente. Os animais não foram alimentados durante o ensaio.

A mortalidade foi registada a cada mudança de água e todos os indivíduos com as valvas abertas ou semi-abertas, e que não reagiram a um toque externo, foram considerados mortos. A cada troca de água, a actividade das valvas das amêijoas foi observada e foi registado o número de animais vivos com as valvas fechadas ou animais vivos com as valvas abertas.

### **2.2.3. Ensaio com salinidades altas: desenho experimental**

Foi realizado um ensaio com duração de 6 dias (144h) para determinar os efeitos de toxicidade de salinidades altas na sobrevivência de juvenis de *V. corrugata* com o objectivo de determinar o limite de tolerância salino superior. Procedeu-se à medição média do comprimento da concha dos juvenis e determinou-se o seu índice de condição médio (comprimento da concha  $7,46 \pm 1,15$  mm; IC: 11,1%). Nove salinidades foram seleccionadas: 30 (controlo); 32,5; 35; 37,5; 40; 42,5; 45; 47,5 e 50 psu. A metodologia foi semelhante à detalhada no ponto acima, no entanto, no tratamento gradual, a salinidade ascendeu 2,5 psu a cada 12h até atingir a concentração definida. Neste ensaio, o pH ( $7,8 \pm 0,2$ ) e a amónia (0mg/L) também foram medidos regularmente.

### **2.2.4. Tratamento estatístico**

Os dados obtidos nos ensaios acima descritos foram analisados com o auxílio do programa estatístico Prism 6. Realizaram-se testes de Análise de Variância a um factor (doravante designado apenas pelo acrónimo ANOVA) com o objectivo de comparar a mortalidade dos animais expostos às diferentes salinidades após intervalos de tempo específicos, seguidos de comparações múltiplas de Dunnett's para determinar diferenças significativas entre o controlo e diferentes salinidades. Os resultados são considerados estatisticamente significativos para  $\alpha \leq 0,05$ . Para comparar a mortalidade dos animais expostos às mesmas salinidades em dois tratamentos diferentes foi usado o teste-t. Sendo que os dados analisados correspondem a mortalidade, todos os valores de percentagem de mortalidade foram transformados no arco seno da raiz quadrada da respectiva proporção.

## 2.3. Ensaios de salinidade com diferentes índices de condição

Neste ensaio os efeitos do stresse salino na sobrevivência de juvenis de *V. corrugata* são avaliados em indivíduos com índices de condição diferentes para se perceber se o impacto da diminuição da salinidade da água pode ser mitigado ao manter os juvenis bem alimentados, nomeadamente, através de um maior suplemento de microalgas em alturas que antecedem os períodos de maior precipitação.

### 2.3.1. Proveniência dos animais e aclimação

Os juvenis (comprimento da concha:  $7,21 \pm 1,12$  mm; IC: 11,0%) foram divididos em dois lotes e cada um foi mantido num aquário com 40L de água durante 14 dias, a uma salinidade de  $30 \pm 1$  psu e temperatura de  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ , com arejamento constante e com renovação diária de 50% da água. Durante este período de aclimação as amêijoas de um dos lotes foram alimentadas diariamente com as microalgas *Isochrysis galbana* e *Skeletonema costatum* numa razão de 40 cél/ $\mu\text{L}$  de *I. galbana* e 20 cél/ $\mu\text{L}$  de *S. costatum*. As amêijoas do outro lote não foram alimentadas durante a aclimação. Toda a água salgada usada foi feita artificialmente. A água artificial utilizada na aclimação obteve-se pela dissolução de sal sintético (Ocean Fish, Prodac International, Italy) em água doce filtrada proveniente da rede pública, deixada previamente a arejar durante 24h.

### 2.3.2. Determinação do índice de condição

Após a aclimação, o índice de condição foi determinado nos dois lotes. Procedeu-se à pesagem individual, com o auxílio de uma balança de precisão (Balance analytical A&D Instruments, GR-200-EC, resolução de 0,1 mg), e à sua medição individual, com o auxílio de uma craveira digital (resolução de 0,05 mm). Uma vez que os tecidos destes juvenis apresentam um peso diminuto, a determinação do IC efectuou-se por grupos de 3 indivíduos. Separou-se o tecido da concha de cada indivíduo, os quais foram colocados a secar na estufa a  $60^\circ\text{C}$  durante um período de 48h. Findo este tempo, efectuou-se uma pesagem, após arrefecimento em exsiccador. O IC foi calculado para esta espécie de acordo com Walne (1976) através da fórmula:

$$\text{IC}(\%) = \frac{\text{peso seco dos tecidos}}{\text{peso seco da concha}} \times 100$$

### **2.3.3. Desenho experimental**

Para os ensaios experimentais utilizou-se água doce proveniente da rede pública após ter sido sujeita a osmose inversa, na qual se dissolveu sal sintético (Ocean Fish, Prodac International, Italy) de acordo com as concentrações pretendidas. Foram realizadas medições regulares da salinidade com o auxílio de um refractómetro portátil (Zuzi model C-1).

Os juvenis de cada um dos lotes foi exposto a três salinidades diferentes: 30; 12,5 e 50 psu, numa experiência com duração de 10 dias (240h). Para cada condição foram realizadas 3 réplicas e cada uma composta por 30 indivíduos. Cada réplica foi mantida num frasco de vidro com capacidade para 0,8L, no qual se colocou 0,65L de água com arejamento constante, a uma temperatura de  $16\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuridão. O pH ( $8,0\pm 0,2$ ) e a amónia (0mg/L) foram medidos regularmente através da sonda de pH e do teste de amónia/amoníaco da marca Sera, respectivamente. Os animais não foram alimentados durante o ensaio.

A mortalidade foi registada a cada 24h e todos os indivíduos com as valvas abertas ou semi-abertas, e que não reagiram a um toque externo, foram considerados mortos. Após registo da mortalidade, a água de cada recipiente foi trocada e a actividade das valvas das amêijoas foi observada e foram registados o número de animais vivos com as valvas fechadas ou animais vivos com as valvas abertas. O tratamento estatístico foi realizado como descrito no sub-capítulo 2.2.4 (ver acima).

## **2.4. Ensaio de temperatura**

### **2.4.1. Proveniência dos animais e aclimação**

Para esta experiência foram utilizados juvenis de *V. corrugata*, que permaneciam mantidos no Tanque da Saltoa. O trabalho realizado pretende determinar os efeitos de diferentes temperaturas na sobrevivência de juvenis de *V. corrugata* com o objectivo de determinar o limite de tolerância térmico superior. Todo o procedimento de aclimação foi semelhante ao descrito no sub-capítulo 2.2.1 (ver acima). Por forma a expor os animais às temperaturas observadas na aquacultura durante Abril e Maio de 2016, foram seleccionadas cinco temperaturas: 16 (controlo), 19, 22, 25 e  $28^{\circ}\text{C}$ , e a duração da experiência foi de 9 dias (216h).

#### **2.4.2. Desenho experimental**

Após aclimação, efectuou-se a medição média do comprimento da concha dos juvenis e determinou-se o seu índice de condição médio (comprimento da concha  $7,92 \pm 1,28$  mm; IC: 12,5%). Foram realizadas 3 réplicas da experiência -para cada concentração- cada uma composta por 30 indivíduos. Cada réplica foi mantida num frasco de vidro com capacidade para 0,8L, no qual se colocou 0,65L de água com arejamento constante. As temperaturas ( $16 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ) foram obtidas com o auxílio de resistências e banho maria. O fotoperíodo (16h de luz/8h de escuridão) e a salinidade (30 psu) foram mantidos constantes e os animais não foram alimentados durante o ensaio. O pH ( $8,0 \pm 0,1$ ) e a amónia (0mg/L) foram medidos regularmente ao longo do período do ensaio. A mortalidade registada a cada mudança de água e todos os indivíduos com as valvas abertas ou semi-abertas, e que não reagiram a um toque externo, foram considerados mortos. O tratamento estatístico foi realizado como descrito no sub-capítulo 2.2.4 (ver acima).

### **2.5. Ensaio de temperatura com diferentes índices de condição**

#### **2.5.1. Proveniência dos animais, aclimação e determinação do índice de condição**

Neste ensaio foram avaliados os efeitos de stresse térmico na sobrevivência de juvenis de *V. corrugata* com diferentes índices de condição. Procedeu-se à aclimação de juvenis de *V. corrugata* (comprimento da concha  $7,54 \pm 1,04$  mm; IC:11,9%) de acordo com o procedimento descrito no sub-capítulo 2.3.1 (ver acima) e após esse período o índice de condição foi determinado de acordo com o procedimento descrito no sub-capítulo 2.3.2 (ver acima).

#### **2.5.2. Desenho experimental**

Foram seleccionadas 3 temperaturas: 16 (controlo), 25 e  $28^\circ\text{C}$ , dois valores de temperatura que podem ocorrer em tanques de aquacultura, e a duração da experiência foi de 7 dias (168h).

Foram realizadas 3 réplicas para cada temperatura testada composta por 30 indivíduos cada e foram utilizados frascos de vidro de 0,8L, com 0,65L de água com arejamento constante. As temperaturas ( $16 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ) foram obtidas com o auxílio de resistências e banho maria. O fotoperíodo (16h de luz/8h de escuridão) e a salinidade (30 psu) foram mantidos constantes e os animais não foram alimentados durante a experiência. O pH ( $8,1 \pm 0,1$ ) e a amónia (0mg/L) foram medidos regularmente ao longo do período do ensaio. A mortalidade foi registada a cada 24h e

todos os indivíduos com as valvas abertas ou semi-abertas, e que não reagiram a um toque externo, foram considerados mortos. O tratamento estatístico foi realizado como descrito no sub-capítulo 2.2.4 (ver acima).

## **2.6. Ensaio de temperatura e salinidade com diferentes índices de condição**

### **2.6.1. Proveniência dos animais, aclimação e determinação do índice de condição**

Este trabalho avalia os efeitos da interacção do stress térmico e salino na sobrevivência de juvenis de *V. corrugata* com diferentes índices de condição. Juvenis de *V. corrugata* (comprimento da concha  $8,42 \pm 1,00$  mm; IC:10,6%) foram trazidos e aclimatados de acordo com o procedimento descrito no sub-capítulo 2.3.1 (ver acima) e após esse período o índice de condição foi determinado de acordo com o procedimento descrito no sub-capítulo 2.3.2 (ver acima).

### **2.6.2. Desenho experimental**

Foram seleccionadas duas temperaturas: 16 (controlo) e 25°C; e duas salinidades: 30 (controlo) e 12,5 psu. Para cada condição experimental (alimentadas -A- e não alimentadas -NA-) foram efectuados quatro tratamentos diferentes: 16°C e 30 psu; 16°C e 12,5 psu; 25°C e 30 psu; 25°C e 12,5 psu. Cada tratamento apresentou 3 réplicas, com 30 indivíduos cada e foram utilizados frascos de vidro de 0,8L, com 0,65L de água e com arejamento constante. As temperaturas ( $16 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), o fotoperíodo (16h de luz/8h de escuridão) e a salinidade (30 e 12,5 psu) foram mantidos constantes e os animais não foram alimentados durante os 9 dias (216h) de duração do ensaio. O pH ( $8,0 \pm 0,1$ ) e a amónia (0mg/L) foram medidos regularmente ao longo do período do ensaio. A mortalidade foi monitorizada a cada mudança de água e todos os indivíduos com as valvas abertas ou semi-abertas, e que não reagiram a um toque externo, foram considerados mortos. A cada troca de água, a actividade das valvas das amêijoas foi observada e foram registados o número de animais vivos com as valvas fechadas ou animais vivos com as valvas abertas.

### **2.6.3. Tratamento estatístico**

Os dados foram analisados com o auxílio do programa estatístico Prism 6. Realizaram-se testes de Análise de Variância a dois factores, com o objectivo de comparar a mortalidade dos animais expostos às diferentes temperaturas e salinidades após intervalos de tempo específicos, seguidos de comparações múltiplas de Sidak's para determinar diferenças significativas entre

grupos de tratamentos. Os resultados são considerados estatisticamente significativos para  $\alpha \leq 0,05$ . Sendo que os dados analisados correspondem a mortalidade, todos os valores de percentagem de mortalidade foram transformados no arco seno da raiz quadrada da respectiva proporção.

## **2.7. Stresse oxidativo**

### **2.7.1. Proveniência dos animais e aclimação**

Os juvenis de *V. corrugata* utilizados neste estudo, provenientes da maternidade holandesa, Hatchery Roem Van Yerseke, foram transportados para o Laboratório de Ecologia Marinha e Estuarina (LEME) no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro onde foram mantidos num aquário com 40L de água, a  $30 \pm 1$  psu e  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ , com arejamento constante e renovação diária de 50% da água, durante 7 dias. Durante este período de aclimação, as sementes foram alimentadas diariamente com as microalgas *Isochrysis galbana* e *Skeletonema costatum* numa razão de 30 cél/ $\mu\text{L}$  de *I. galbana* e 30 cél/ $\mu\text{L}$  de *S. costatum*. Toda a água salgada usada foi feita artificialmente. Para a aclimação, o sal sintético foi dissolvido em água doce, a qual foi obtida da rede pública e deixada previamente a arejar durante 24h.

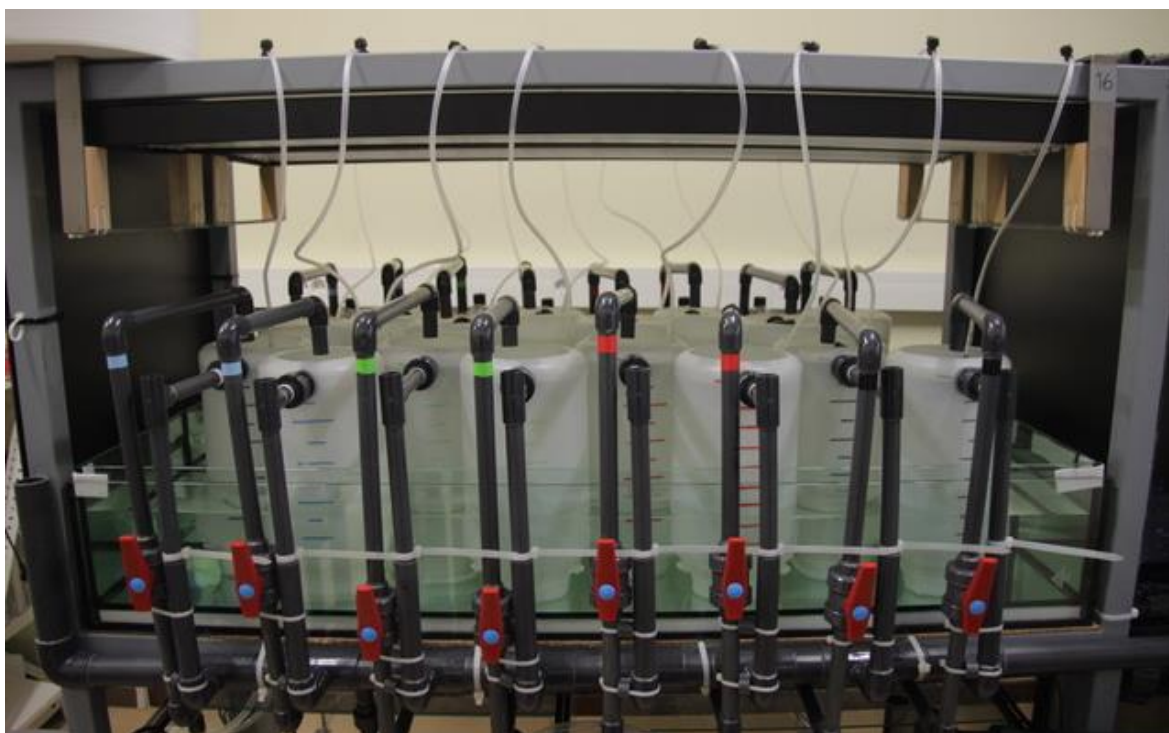
### **2.7.2. Desenho experimental**

Para o ensaio experimental, o sal sintético foi dissolvido em água doce, obtida da rede pública e sujeita a osmose inversa. Após aclimação, efectuou-se a medição média do comprimento da concha dos juvenis e determinou-se o seu índice de condição médio (comprimento da concha  $6,79 \pm 0,34$  mm; IC: 12,9%).

Foram seleccionadas quatro salinidades: 15; 20; 25; e 30 psu (controlo) e quatro temperaturas: 16 (controlo), 19, 22 e  $25^\circ\text{C}$ , num total de 16 tratamentos e cada um com duas réplicas. Em cada réplica foi utilizado um garrafão com 5L de água (Fig. 13) e com 250 indivíduos cada, num total de 32 garrafões, e 15% da água foi renovada diariamente em cada garrafão. A salinidade, a temperatura, o pH ( $7,8 \pm 0,2$ ) e o oxigénio dissolvido ( $9,1 \pm 0,3$  mg/L) foram medidos regularmente através de um refractómetro portátil (Zuzi model C-1) e da sonda de temperatura, pH e  $\text{O}_2$  (WTW Multi 3420 SET C), respectivamente. Os animais não foram alimentados durante a exposição.

Os juvenis iniciaram este ensaio à salinidade de 30 psu e temperatura de  $16^\circ\text{C}$ . Para a obtenção de todas as condições experimentais, a salinidade descendeu diariamente 1 psu e a temperatura ascendeu diariamente  $1,5^\circ\text{C}$  até atingir as condições definidas. Ao fim de 9 dias, todas

as condições experimentais foram obtidas e os animais permaneceram expostos a estas por mais uma semana, após a qual realizou-se a recolha de indivíduos para stress oxidativo. Foram recolhidos aleatoriamente três réplicas de 10 animais por garrafão e procedeu-se à imediata separação e congelamento dos tecidos em azoto líquido. As amostras foram preservadas a -80°C até ao seu processamento. Nota que não foi possível recolher os indivíduos necessários em todos os garrafões dada a elevada mortalidade.



**Figura 13-** Aparato experimental do ensaio com descida de salinidade e subida de temperatura para posterior recolha de indivíduos para stress oxidativo.

### **2.7.3. Análise bioquímica**

Para a análise bioquímica cada amostra foi homogeneizada, utilizando um homogeneizador Potter-Elvehjem, numa razão 1:6 (1g de tecido: 6mL de tampão fosfato: 0,1M, pH 7,4). Foi retirada uma alíquota de 100  $\mu$ L para análise de LPO, a esta juntou-se 5  $\mu$ L de BHT 4% em metanol e 45  $\mu$ L de tampão fosfato e de seguida foi congelada para análise posterior. O restante homogeneizado foi centrifugado (Eppendorf5415R) a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C e o PMS foi removido e preservado a -80°C até análise.

O LPO foi determinado de acordo com Bird and Draper (1984) e adaptado por Filho et al. (2001). O princípio do método baseia-se na avaliação do nível de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais formados pela peroxidação lipídica. Neste método, foram adicionados a cada 75  $\mu$ L

de amostra homogeneizada: 250  $\mu\text{L}$  de TCA (ácido tricloroacético) a 12%, 225  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 60 mM (pH 7,4) e 0,1mM DTPA (ácido dietilenotriamapentaacético) e 250  $\mu\text{L}$  de TBA (ácido tiobarbitúrico) a 0,73%. Após misturada, as mostras foram levadas a ferver (100°C) durante 1h, foram posteriormente colocadas em gelo até arrefecer e levadas a centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos. Com o auxílio de um leitor de placas SpectraMax 190, a absorvância foi medida a 535 nm, os resultados foram expressos em nmol de TBARS (substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico) formados por mg de proteína e calculados através do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Para determinação da proteína do homogeneizado do LPO foi colocado 10  $\mu\text{L}$  de homogeneizado em cada poço da microplaca, seguido de 250  $\mu\text{L}$  de biureto. Foi levado a incubar a 25°C durante 30 minutos e procedeu-se à leitura da absorvância a 550 nm.

A actividade da CAT foi determinada de acordo com o método de Claiborne (1985) e Giri et al. (1996). O princípio do método baseia-se na decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sendo que a velocidade da reacção é sempre proporcional à quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente. Para determinação desta actividade foi utilizada uma diluição do PMS de 1:3. Foram colocados em cada poço da microplaca 5  $\mu\text{L}$  de PMS diluído e 195  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM. A absorvância foi medida a 240 nm durante 2 minutos de 10 em 10 segundos, os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumidos por minuto por mg de proteína e calculados através do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 43,5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

A actividade da GST foi determinada de acordo com Habig et al. (1974). O princípio do método baseia-se na catalisação do CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH, formando tioéter. Para determinação da actividade da GST foi utilizada uma diluição do PMS de 1:20. Foram aos 100  $\mu\text{L}$  de PMS, 170  $\mu\text{L}$  de GSH 1,765 mM e 30  $\mu\text{L}$  de CDNB. A absorvância foi medida a 340 nm durante 5 minutos em intervalos de 30 segundos, os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB conjugados por minuto por mg de proteína e calculados através do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 9,6 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

A actividade da SOD foi determinada de acordo com o procedimento descrito no kit enzimático RANSOD TM, Randox. O princípio do método baseia-se no uso da xantina e da xantina oxidase para formar radicais do ião superóxido que ao reagir com o INT (cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio) formam um corante vermelho. A actividade da SOD é medida pela percentagem de inibição da reacção. A absorvância foi medida a 505 nm durante 3,5 minutos de 30 em 30 segundos, a actividade da SOD foi calculada pela percentagem de inibição da reacção e os resultados foram expressos em unidades de SOD por mg de proteína. Uma unidade de SOD é a unidade que causa 50% de inibição da taxa de redução do INT de acordo com as condições do ensaio.



A determinação do conteúdo de proteína do PMS foi determinada com o método do Biureto de acordo com Gornall et al. (1949). O princípio do método baseia-se na reacção dos iões de cobre presentes no biureto com os péptidos da amostra. Esta reacção forma um produto de cor roxa cuja intensidade é proporcional à concentração dos péptidos na amostra. A leitura da absorvância foi medida a 550 nm e a 25°C.

#### **2.7.4. Tratamento estatístico**

A análise estatística foi efectuada com o auxílio do programa estatístico SPSS Statistics 25. Devido à ocorrência de mortalidade nalguns tratamentos, em que se perderam todos os animais, não foi possível executar uma ANOVA de dois factores para todas as combinações de salinidades e temperaturas testadas. Realizou-se uma ANOVA de um factor ( $\alpha=0,05$ ), com o objectivo de comparar cada actividade enzimática ou dano lipídico para a salinidade e para a temperatura isoladamente, agrupando-se os tratamentos de acordo com esse critério. Não sendo uma abordagem desejável, foi a única que permitiu obter alguma evidência da significância estatística dos resultados. Complementarmente, realizou-se uma ANOVA de dois factores para apenas duas séries completas de salinidades em duas temperaturas (16°C e 19°C), para avaliar a interacção entre estes dois factores na actividade enzimática ou dano lipídico.

## Capítulo 3- Resultados

### 3.1. Avaliação do índice de condição

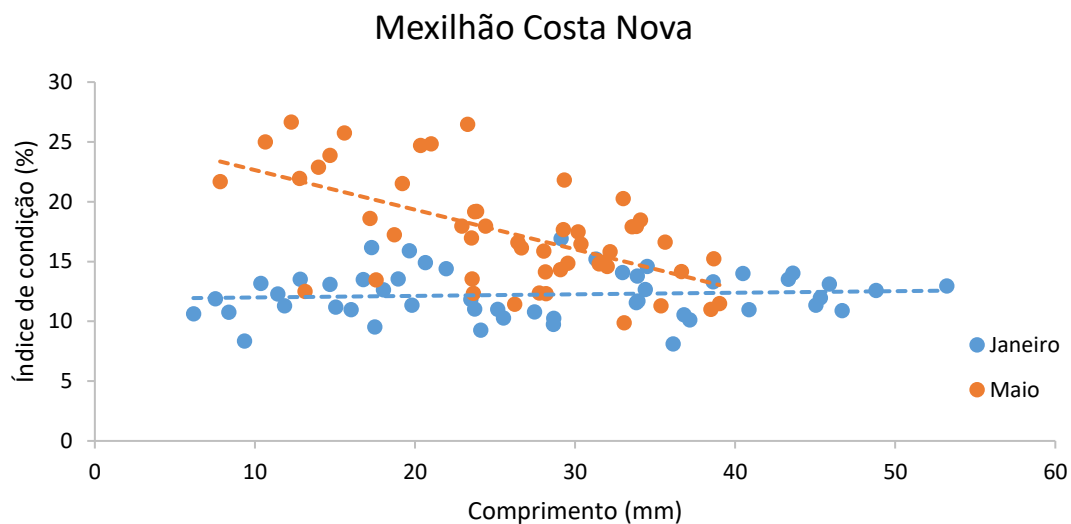
Os valores de IC observados para as diferentes espécies estudadas e épocas do ano estão representados nas figuras 14, 15, 16 e 17.

Relativamente à população de *M. galloprovincialis* amostrada em Janeiro na Costa Nova, não existe uma regressão estatisticamente significativa entre o índice de condição e o tamanho dos animais ( $y=0,0131x+11,863$ ;  $F=0,329$ ;  $p<0,6$ ). A generalidade dos valores de IC variaram entre 10% e 15% para toda a gama de tamanhos analisada. No entanto, no mês de Maio obteve-se uma regressão estatisticamente significativa entre o índice de condição e o tamanho dos animais ( $y=-0,3311x+25,953$ ;  $F=25,936$ ;  $p<0,001$ ), mostrando uma diminuição do IC com o aumento do comprimento dos indivíduos. Além disso, os juvenis apresentaram um IC maior em Maio do que em Janeiro, sendo a média do IC de Maio dos indivíduos até 20mm de 21% e a média do IC de Janeiro para a mesma gama de tamanhos de 12%.

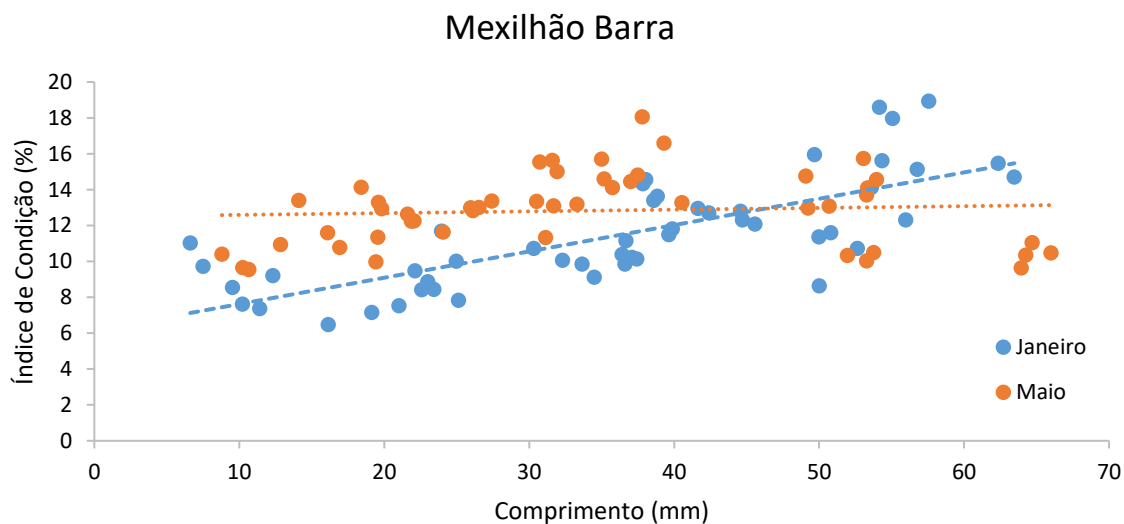
No que diz respeito à população de *M. galloprovincialis* amostrada em Janeiro na Barra, houve uma regressão estatisticamente significativa entre o índice de condição e o tamanho dos animais ( $y=0,1468x+6,1536$ ;  $F=63,406$ ;  $p<0,001$ ), indicando que há um aumento do IC com o aumento do comprimento dos indivíduos. No mês de Maio essa regressão não foi significativa ( $y=0,0097x+12,494$ ;  $F=0,282$ ;  $p<0,6$ ). Os juvenis apresentaram um IC maior em Maio que em Janeiro, sendo a média do IC para indivíduos até 20mm de 12% em Maio e de 8% em Janeiro. Além disso, os adultos com comprimento superior a 45mm apresentaram uma média do IC inferior em Maio, com um valor médio de 12%, do que em Janeiro, com um valor médio de 14%.

No mês de Janeiro, verificou-se que, para as diferentes populações de *M. galloprovincialis*: Costa Nova e Barra, houve diferenças muito altamente significativas entre o índice de condição de indivíduos com comprimento da concha <30 mm e os diferentes locais (teste-t:  $F=3,103$ ;  $p<0,001$ ), mostrando que os juvenis da Costa Nova apresentaram um IC superior (IC médio=12%) ao IC dos juvenis da Barra (IC médio=9%). No que diz respeito aos indivíduos com comprimento da concha  $\geq 30$  mm, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o índice de condição e os diferentes locais e os indivíduos de ambos os locais apresentaram um IC médio de 13%. Relativamente ao mês de Maio, para as diferentes populações de *M. galloprovincialis*: Costa Nova e Barra, verificaram-se diferenças muito altamente significativas entre o índice de condição de indivíduos com comprimento da concha <30 mm e os diferentes locais (teste-t:  $F=6,413$ ;  $p<0,001$ ), mostrando que os juvenis da Costa Nova apresentaram, novamente, um IC superior (IC médio=20%) ao IC dos juvenis da Barra (IC médio=14%). No que diz respeito aos indivíduos com comprimento

da concha  $\geq 30$  mm, verificaram diferenças significativas entre o índice de condição e os diferentes locais (teste-t:  $F=1,337$ ;  $p<0,05$ ), sendo que os juvenis da Costa Nova apresentaram um IC superior (IC médio=15%) ao IC dos juvenis da Barra (IC médio=13%).



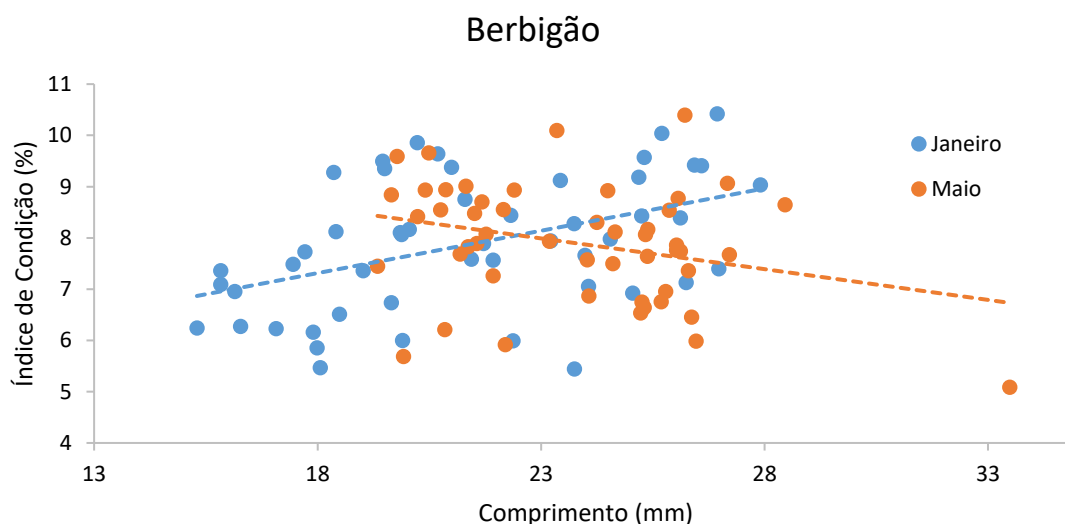
**Figura 14-** Índice de condição de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* recolhido no esporão da Praia da Costa Nova em Janeiro e Maio de 2018.



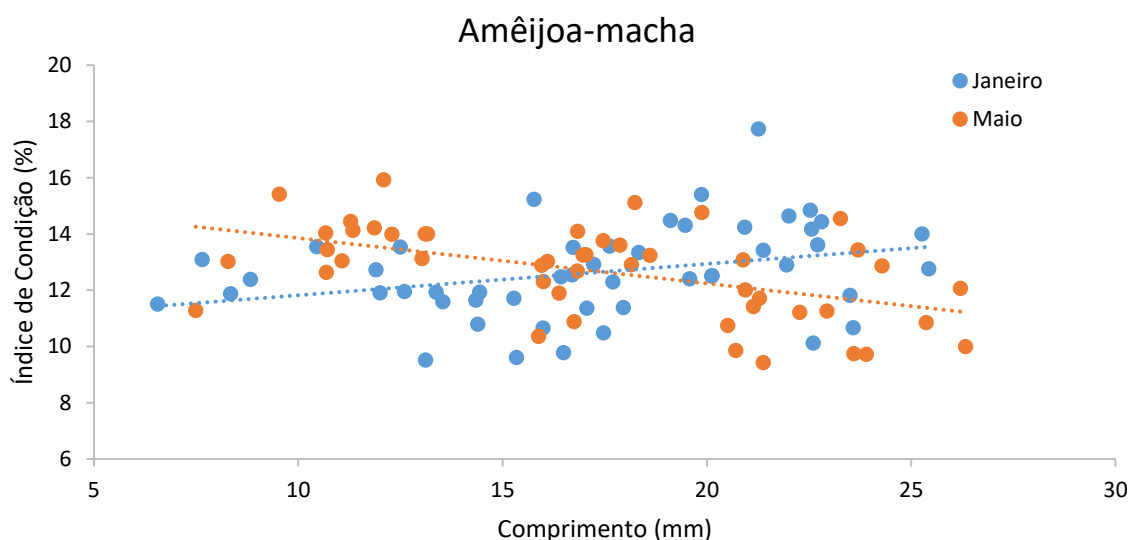
**Figura 15-** Índice de condição de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* recolhido no Canal de Mira em Janeiro e Maio de 2018.

Para a espécie *C. edule* houve uma regressão estatisticamente significativa entre o índice de condição e o tamanho dos animais nos meses de Janeiro ( $y=0,1652x+4,3395$ ;  $F=11,671$ ;  $p<0,01$ ) e Maio ( $y=-0,1199x+10,748$ ;  $F=4,526$ ;  $p<0,05$ ), mas as tendências foram opostas: em Janeiro o IC

aumentou com o tamanho dos animais, enquanto que em maio diminuiu. Os indivíduos com um comprimento entre 18 e 22mm apresentaram o mesmo valor de IC médio de 8% para ambas as épocas do ano e os indivíduos com comprimento superior a 25mm apresentam uma média do IC de Janeiro de 9% e de 8% para Maio.



**Figura 16-** Índice de condição de berbigão *Cardium edule* recolhido no Canal de Mira em Janeiro e Maio de 2018.



**Figura 17-** Índice de condição de amêijoia-macha *Venerupis corrugata* recolhida no Tanque da Saltoa em Janeiro e Maio de 2018.

Em relação à espécie *V. corrugata*, houve uma regressão estatisticamente significativa entre o índice de condição e o tamanho dos indivíduos nos meses de Janeiro ( $y=0,1116x+10,703$ ;  $F=5,542$ ;  $p<0,05$ ) e Maio ( $F=15,903$ ;  $p<0,001$ ). Para o mês de Janeiro a tendência é do aumento do

IC com o aumento do comprimento dos indivíduos, enquanto que em Maio a tendência é de uma diminuição do IC com o aumento do comprimento dos indivíduos. Verifica-se que os juvenis até 15mm apresentam um IC superior em Maio que em Janeiro, sendo a média do IC de Maio de 14% e a média do IC de Janeiro de 12%. Os indivíduos com comprimento superior a 20mm apresentam um valor médio do IC em Maio de 11%, valor inferior ao de Janeiro, com um valor médio do IC de 13%.

De uma forma geral os resultados evidenciam que há diferenças no IC em função do local, época do ano e comprimento dos animais. Existem, também, duas tendências que se mostram mais ou menos evidentes para todas as espécies analisadas: em Maio, o IC dos juvenis é superior do que em Janeiro, enquanto que esta relação tende a ser inversa nos adultos.

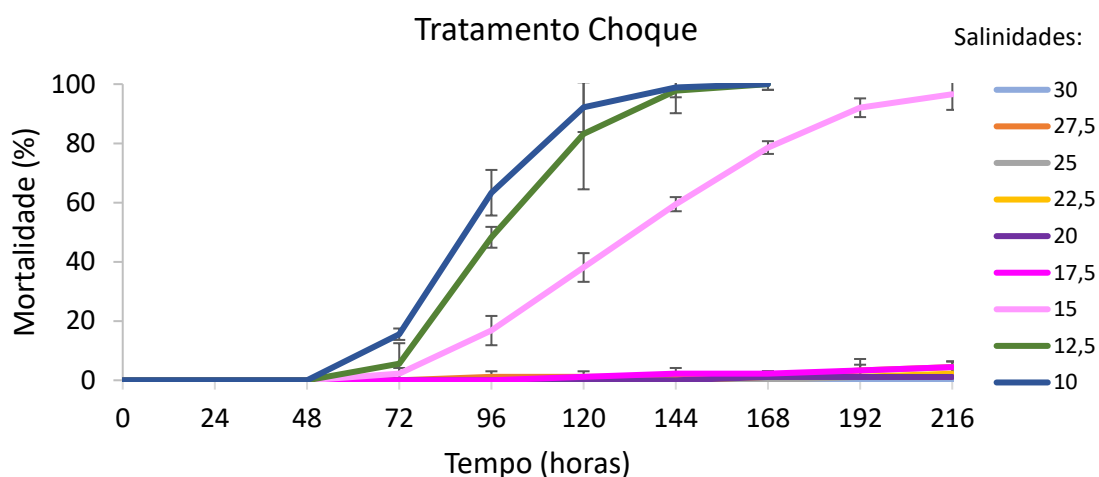
### **3.2. Ensaios de salinidade**

#### **3.2.1. Ensaio com salinidades baixas**

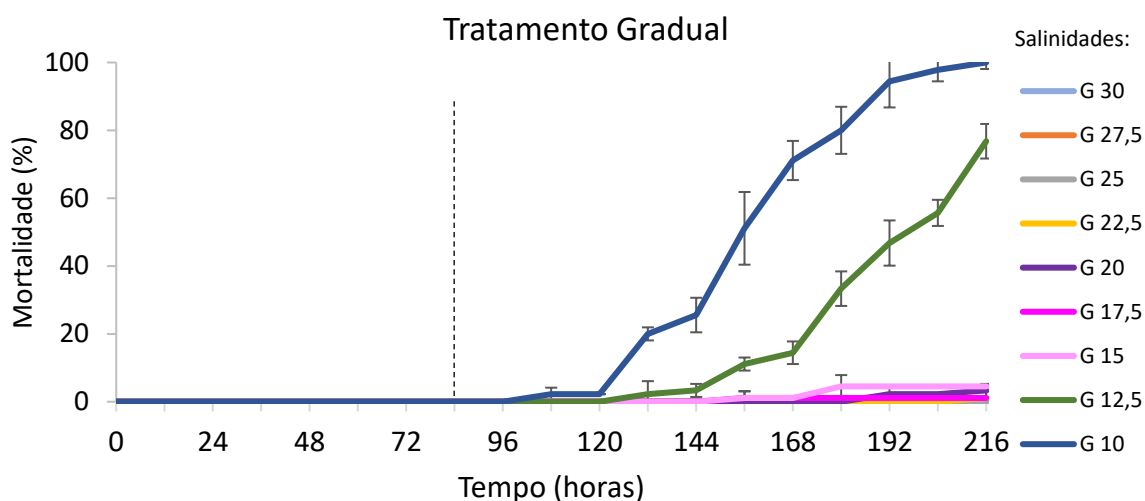
No tratamento de choque, a figura 18 revela que ao fim de 3 dias (72h) inicia-se um aumento da mortalidade nas salinidades  $\leq 15$  psu, a qual aumenta progressivamente com o tempo. Por exemplo, ao fim de uma semana<sup>2</sup> (168h), há uma diferença muito altamente significativa na mortalidade dos animais expostos às diferentes salinidades (ANOVA:  $F=263,4$ ;  $p<0,001$ ). Ao fim deste tempo as comparações entre cada salinidade, através do teste de comparações múltiplas de Dunnett's, revela que há diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo e as salinidades de 15, 12,5 e 10, ou seja, salinidades iguais ou inferiores a 15 psu provocam mortalidade nos juvenis da amêijoia-macha para esse tempo de exposição. É revelante salientar que todos os animais morreram ao fim de uma semana (168h) nas salinidades de 10 e 12,5 psu, e que cerca de 80% morreram ao fim de uma semana a 15 psu, enquanto que no controlo (30 psu) a mortalidade foi cause nula. Ao fim de 9 dias (216h) os animais expostos à salinidade de 15 psu apresentaram uma mortalidade superior a 95%, a qual foi significativamente diferente da registada no controlo (ANOVA:  $F=141,1$ ;  $p<0,001$ ; comparações múltiplas de Dunnett's:  $p<0,001$ ) que se manteve quase nula (Fig. 18).

---

<sup>2</sup> Uma semana e duas semanas são considerados intervalos de tempo de referência visto que foi observado que no interior de tanques de cultivo na Ria de Aveiro a água permanece com valores reduzidos de salinidade entre uma e duas semanas após ocorrem fenómenos muito intensos de precipitação.



**Figura 18-** Percentagem média de mortalidade de juvenis de *V. corrugata* expostos a salinidades baixas. Os animais foram expostos directamente (sem transição gradual) a diferentes concentrações salinas após aclimação a 30 psu (“tratamento de choque”).



**Figura 19-** Percentagem média de mortalidade de juvenis de *V. corrugata* expostos a uma descida gradual de salinidade. **G30-** 30 psu (controlo); **G27,5-** Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 27,5 psu; **G25-** Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 25 psu; **G22,5-** Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 22,5 psu; **G20-** Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 20 psu; **G17,5-** Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 17,5 psu; **G15-** Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 15 psu; **G12,5-** Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 12,5 psu; **G10-** Descida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 10 psu.

No que diz respeito ao tratamento gradual, ao fim de 84h todas as soluções de exposição atingiram a salinidade final pretendida. Em consequência disso, o aumento da mortalidade observada nas salinidades mais baixas deste tratamento ocorreu ao fim de um maior tempo de exposição (108h), em comparação com o tratamento de choque (72h) (Fig. 18 e 19).

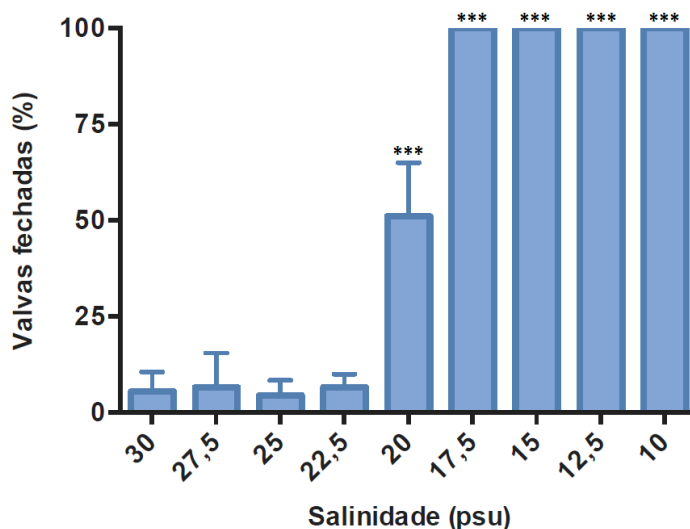
Ao comparar a mortalidade dos animais expostos às diferentes salinidades ao fim de 9 dias (216h) verifica-se que o resultado do teste foi significativo (ANOVA:  $F=126,1$ ;  $p<0,001$ ). As comparações entre cada salinidade, através do teste de comparações múltiplas de Dunnett's, revela que há diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre a mortalidade observada no controlo (quase nula) e nas salinidades de 12,5 psu (77%) e 10 psu (100%). A mortalidade registada a 15 psu foi muito baixa (5%) e não significativamente diferente do controlo.

Após comparar os dois tratamentos separadamente, procedeu-se à comparação da taxa de mortalidade dos animais expostos às mesmas salinidades e ao fim do mesmo intervalo de tempo em ambos os tratamentos, choque e gradual. A salinidade de 15 psu foi atingida no tratamento gradual ao fim de 60h, ou seja, estes animais estiveram expostos a esta salinidade durante 156h do ensaio. Foi realizado um teste-t para comparar a taxa de mortalidade dos animais após 144h de exposição no tratamento de choque (uma vez que no tratamento de choque a mortalidade foi registada de 24 em 24h não há registo de mortalidade às 156h) e após 204h no tratamento gradual. O teste foi altamente significativo ( $p<0,01$ ), mostrando que, para o mesmo período de exposição, a mortalidade observada na salinidade de 15 psu é superior no tratamento de choque (60%) do que no tratamento gradual (5%). Para a salinidade de 12,5 psu, no tratamento gradual esta concentração foi atingida ao fim de 72h, sendo que estes animais estiveram expostos a esta salinidade durante 144h da experiência. Foi então realizado um teste-t para comparar a taxa de mortalidade dos animais após 144h de exposição no tratamento de choque e após 216h no tratamento gradual. O teste foi altamente significativo ( $p<0,01$ ), assim, para o mesmo período de exposição, a mortalidade observada na salinidade de 12,5 psu é superior no tratamento de choque (98%) do que no tratamento gradual (77%). Por fim, foi efectuado o mesmo procedimento para a salinidade de 10 psu, que foi atingida no tratamento gradual ao fim de 84h, estando estes animais expostos a esta salinidade durante 132h da experiência. Foi realizado um teste-t para comparar a taxa de mortalidade dos animais após 120h de exposição no tratamento de choque (uma vez que no tratamento de choque a mortalidade foi registada de 24 em 24h não há registo de mortalidade às 132h) e após 204h no tratamento gradual. O teste não revelou diferenças significativas para a salinidade de 10 psu, ou seja, para esta salinidade a transição gradual da descida de salinidade não teve influência na mortalidade dos animais, tendo esta taxa atingido valores superiores a 90% para ambos os tratamentos e ao fim do mesmo tempo de exposição.

No tratamento de choque, todas as amêijoas expostas a salinidades de 17,5, 15, 12,5 e 10 psu fecharam as valvas imediatamente após a sua colocação nas águas com as respectivas salinidades.



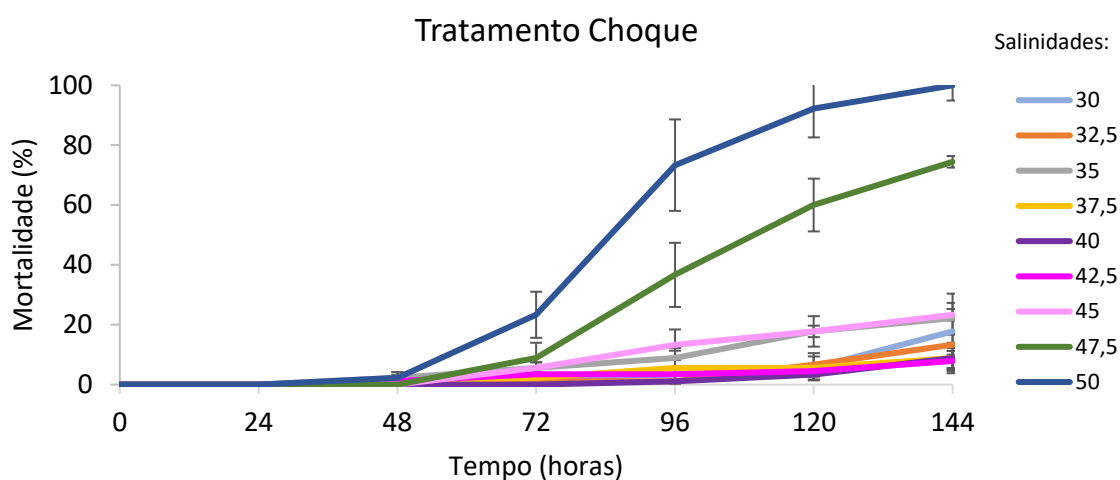
Houve uma diferença altamente significativa entre as percentagens de animais com valvas fechadas no momento inicial (0h) de exposição às diferentes salinidades (ANOVA:  $F=185,1$ ;  $p<0,0001$ ). As comparações múltiplas de Dunnett's revelam que para salinidades  $\leq 20$  psu, a percentagem de animais com valvas fechadas foi significativamente superior ( $p<0,001$ ) ao controlo (30 psu) (Fig. 20).



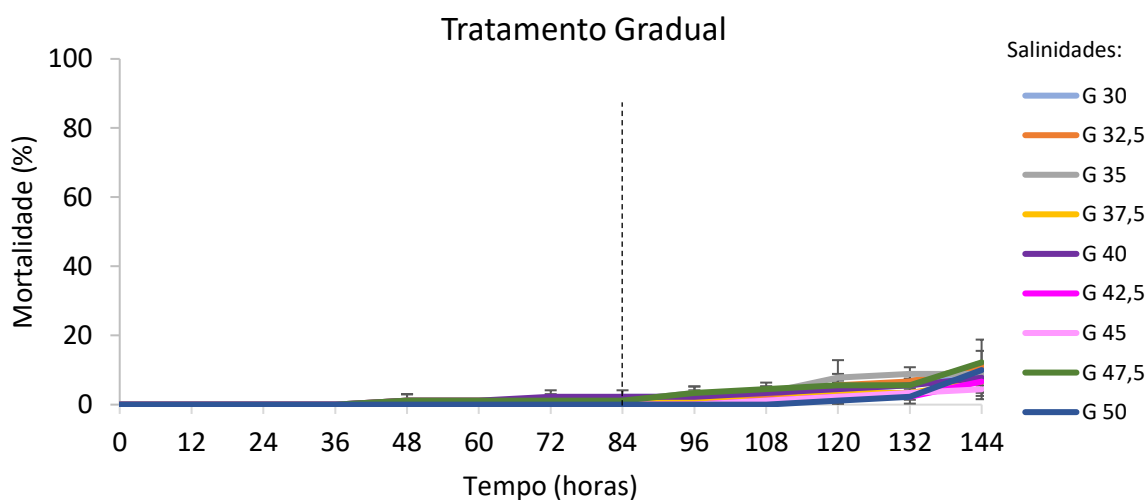
**Figura 20-** Percentagem média de juvenis de *V. corrugata* com as valvas fechadas quando expostas a diferentes salinidades no início da experiência (T=0h). Diferenças significativas \*\*\* $p<0,001$  em comparação com o controlo.

### 3.2.2. Ensaio com salinidades altas

No tratamento de choque, a figura 21 revela que ao fim de 3 dias (72h) de exposição inicia-se um aumento da mortalidade nas salinidades  $\geq 47,5$  psu, a qual aumenta gradualmente ao longo do tempo. Ao fim de 6 dias (144h), verificou-se 100% de mortalidade na salinidade de 50 psu, 75% de mortalidade na salinidade de 47,5 psu e para salinidades  $\leq 45$  psu a mortalidade não ultrapassou os 25%. Para 48h de exposição não há diferenças significativas entre as diferentes concentrações de salinidade, no entanto, verificou-se a existência de uma diferença altamente significativa a partir de 3 dias (72h) de exposição (ANOVA (72h):  $F=6,28$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA (96h):  $F=20,70$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA (120h):  $F=32,06$ ;  $p<0,001$ ; ANOVA (144h):  $F=40,20$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. 21). As comparações múltiplas de Dunnett's revelam que existem diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo e a salinidade de 50 psu ao fim de 3 dias de exposição. Revelam também que ao fim de 4 dias, existem diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo e a salinidade de 50 e diferenças altamente significativas ( $p<0,01$ ) entre o controlo e a salinidade de 47,5 psu. Ao fim de 5 e 6 dias, as comparações múltiplas de Dunnett's revelam que existem diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo e as salinidades de 50 e 47,5 psu.



**Figura 21-** Percentagem média de mortalidade de juvenis de *V. corrugata* expostos a salinidades ( $\geq 30$  psu) altas. Os animais foram expostos directamente (sem transição gradual) a diferentes concentrações salinas após aclimação a 30 psu (“tratamento de choque”).



**Figura 22-** Percentagem média de mortalidade de juvenis de *V. corrugata* expostos a uma subida gradual de salinidade. **G30-** 30 psu (controlo); **G32,5-** Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 32,5 psu; **G35-** Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 35 psu; **G37,5-** Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 37,5 psu; **G40-** Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 40 psu; **G42,5-** Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 42,5 psu; **G45-** Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 45 psu; **G47,5-** Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 47,5 psu; **G50-** Subida gradual de salinidade (2,5 psu/12h) até 50 psu.

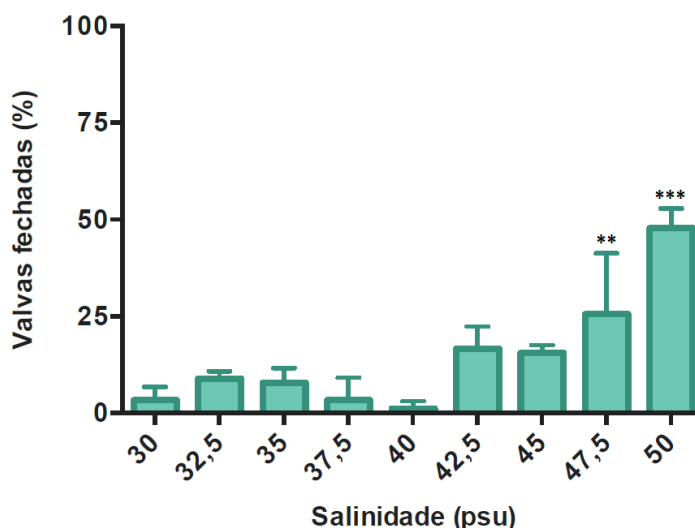
Relativamente ao tratamento gradual, não se verificaram diferenças significativas de mortalidade nas diferentes salinidades ao fim de 6 dias (144h) (Fig. 22).

Após a análise dos dois tratamentos (choque e gradual) separadamente procedeu-se, tal como para as salinidades baixas, à comparação da taxa de mortalidade dos animais expostos às mesmas salinidades e ao fim do mesmo intervalo de tempo em ambos os tratamentos. A salinidade de 47,5 psu foi atingida no tratamento gradual ao fim de 72h, ou seja, estes animais estiveram expostos a esta salinidade durante 72h da experiência. Foi realizado um teste-t para comparar a taxa de mortalidade dos animais após 72h de exposição no tratamento de choque e após 144h no tratamento gradual. O teste revelou-se não significativo. Para a salinidade de 50 psu, no tratamento gradual esta concentração foi atingida ao fim de 84h, sendo que estes animais estiveram expostos a esta salinidade durante apenas 60h da experiência. Foi então realizado um teste-t para comparar a taxa de mortalidade dos animais após 48h de exposição no tratamento de choque e após 132h no tratamento gradual. Este teste também não se mostrou significativo.

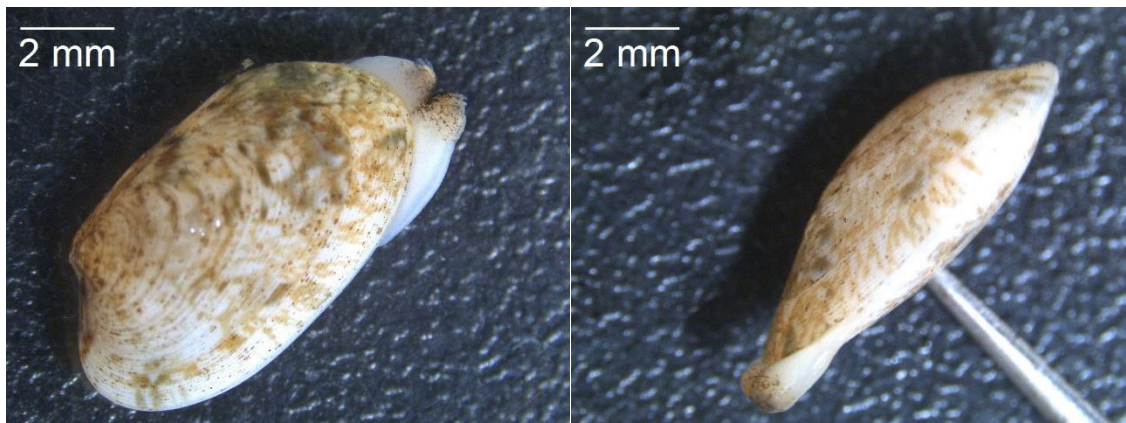
Verificou-se uma diferença altamente significativa entre as percentagens de animais com valvas fechadas no momento inicial (0h) de exposição às diferentes salinidades (ANOVA:  $F=15,54$ ;  $p<0,001$ ).

As comparações múltiplas de Dunnett's revelaram que existem diferenças altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo e a salinidade de 50 psu e diferenças significativas ( $p<0,01$ ) entre o controlo e a salinidade de 47,5 psu (Fig. 23).

Durante a exposição a salinidades altas e baixas foram observados animais com sífões trilhados entre as valvas (Fig. 24). No tratamento de choque este fenómeno foi observado a partir das 48h nas salinidades de 12,5 e 15 psu e a partir das 72 horas na salinidade de 10 psu. O mesmo fenómeno foi também observado nas salinidades altas, nomeadamente 47,5 e 50 psu a partir das 24h de exposição.



**Figura 23-** Percentagem média de juvenis de *V. corrugata* com as valvas fechadas quando expostas a diferentes salinidades no início da experiência (T=0h). Diferenças significativas \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  em comparação com o controlo.



**Figura 24-** Juvenil de *V. corrugata* com os sifões trilhados entre as valvas após 48h de exposição à salinidade de 12,5 psu.

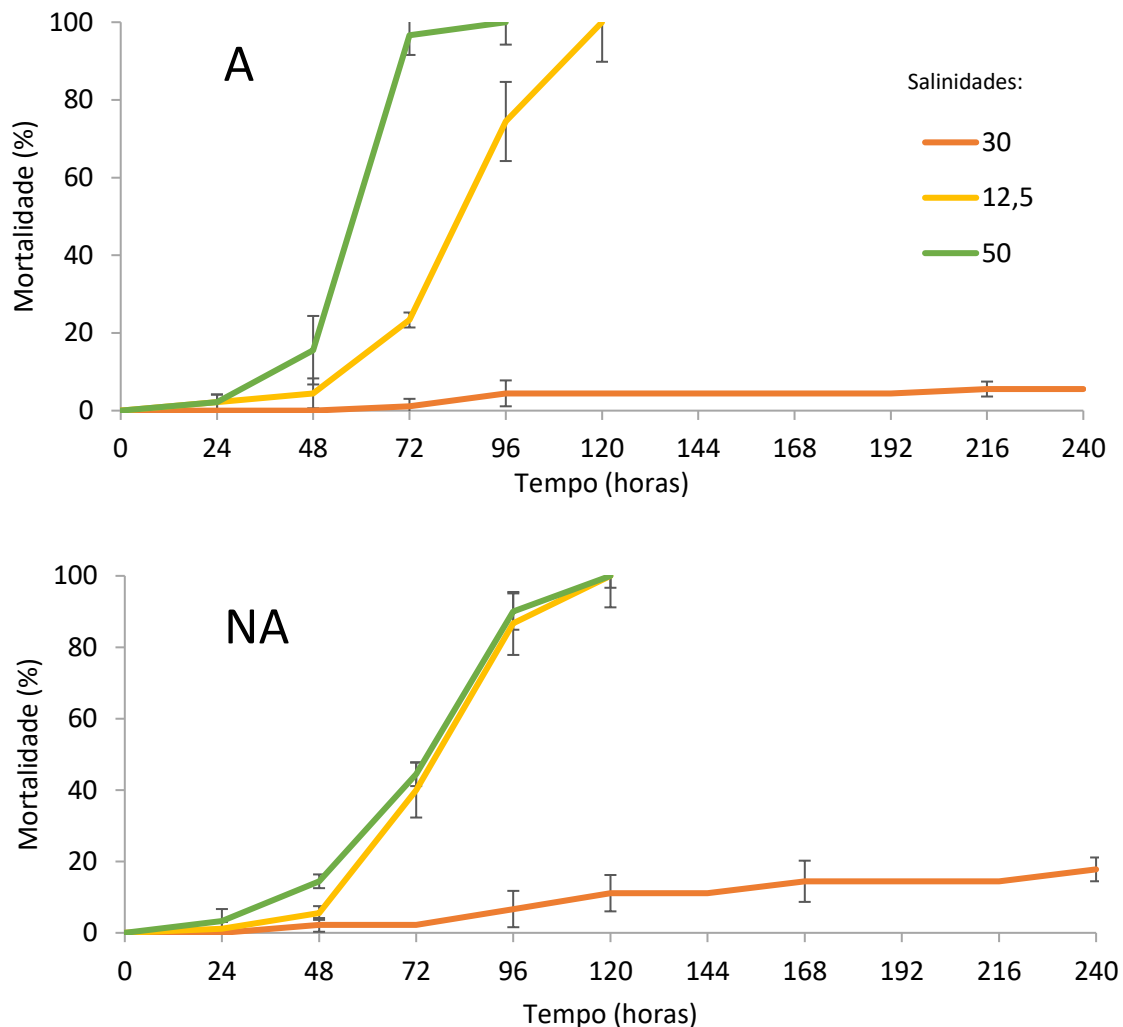
### 3.3. Ensaio de salinidade com diferentes índices de condição

Ao fim de duas semanas de aclimação o IC dos animais alimentados subiu de 11,0% para 13,8%, enquanto que o IC dos animais não alimentados desceu de 11,0% para 9,1%. Conseguiu-se, assim, obter dois lotes de animais com distintos índices de condição (diferença de 4,7%) para os ensaios de exposição a diferentes salinidades.

No tratamento das amêijoas alimentadas, os animais expostos às salinidades de 50 e 12,5 psu alcançaram os 100% de mortalidade ao fim de 4 dias (96h) e 5 dias (120h), respectivamente (Fig. 25A). A figura 25A revela que ao fim de 2 dias (48h) de exposição inicia-se um aumento da mortalidade para as salinidades testadas, excepto o controlo, a qual aumenta exponencialmente nos dois dias seguintes. Ao fim de 4 dias (96h), verifica-se uma diferença muito altamente significativa na mortalidade dos animais alimentados expostos às diferentes salinidades (ANOVA:  $F=123,5$ ;  $P<0,001$ ). As comparações entre cada salinidade ao fim deste tempo, através do teste de comparações múltiplas de Dunnett's, revelam que há diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo e ambas as salinidades testadas: 12,5 e 50 psu. Ao fim de 5 dias (120h) de exposição, também se verificaram diferenças muito altamente significativas na mortalidade dos animais alimentados expostos às diferentes salinidades (ANOVA:  $F=257,4$ ;  $p<0,001$ ) e as comparações entre cada salinidade, através do teste de comparações múltiplas de Dunnett's, revelam que há diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo e a salinidade de 12,5 psu (para este tempo de exposição não restaram animais referentes a 50 psu e por isso não foi possível estabelecer comparações).

No que diz respeito ao tratamento das amêijoas não alimentadas, os animais expostos às salinidades de 50 e 12,5 psu alcançaram os 100% de mortalidade ao fim de 5 dias (120h) (Fig. 25NA). A figura 25NA revela que ao fim de 2 dias (48h) de exposição inicia-se um aumento da mortalidade para as salinidades testadas, excepto o controlo, a qual aumenta exponencialmente nos três dias seguintes. Ao fim de 5 dias (120h), verifica-se uma diferença muito altamente significativa na mortalidade dos animais alimentados expostos às diferentes salinidades (ANOVA:  $F=338,7$ ;  $P<0,001$ ). As comparações entre cada salinidade, através do teste de comparações múltiplas de Dunnett's, revela que há diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo e as salinidades de 12,5 e 50 psu.

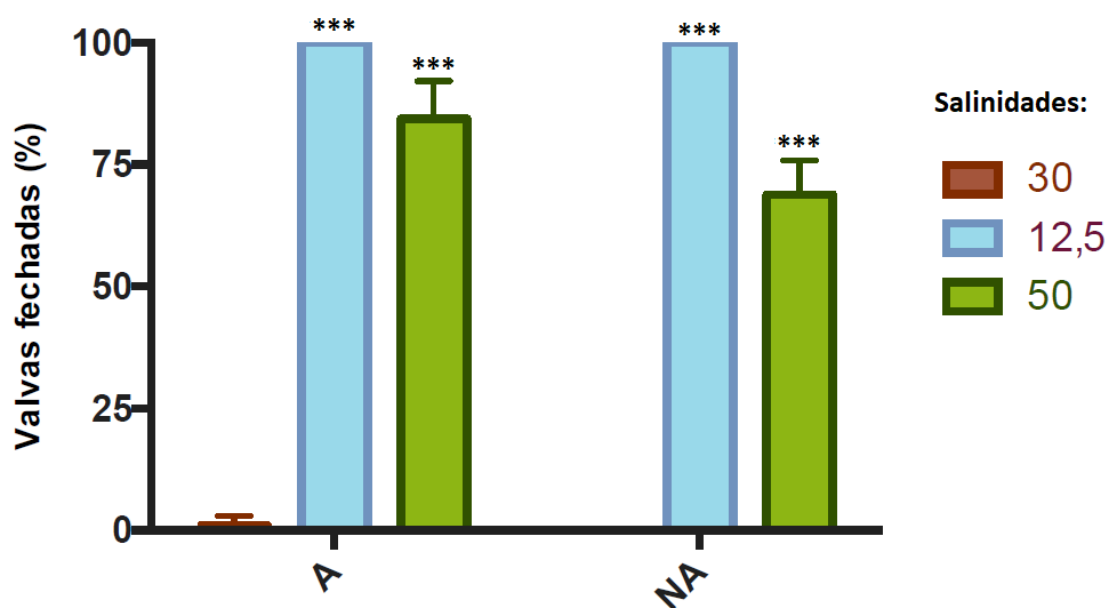
Foram realizados testes-t com o objectivo de comparar a mortalidade dos animais expostos às mesmas salinidades ao fim de 4 dias (96h) em ambos os tratamentos, alimentadas e não



**Figura 25-** Percentagem média de mortalidade de juvenis de *V. corrugata* expostos a diferentes salinidades após duas semanas de aclimação com alimento (A) e sem alimento (NA).

alimentadas, para as salinidades testadas de 30, 12,5 e 50 psu. Verificaram-se diferenças muito altamente significativas ( $p < 0,001$ ) apenas para a salinidade de 50 psu, com a mortalidade a atingir os 100% no tratamento com amêijoas alimentadas e 90% no tratamento com amêijoas não alimentadas. Foi também efectuado um teste-t às ao fim de 10 dias (240h) com o objectivo de comparar a mortalidade dos animais expostos à salinidade de 30 psu em ambos os tratamentos. Foram verificadas diferenças muito altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre ambos os tratamentos, ou seja, a disponibilidade de alimento aumentou a taxa de sobrevivência dos animais expostos à salinidade controlo de 30 psu.

Todas as amêijoas expostas à salinidade de 12,5 psu fecharam as valvas imediatamente após a sua colocação na água, independentemente do seu índice de condição. Já na salinidade de 50 psu, 80% dos animais fecharam as valvas no tratamento com alimento e 69% fecharam as valvas no tratamento sem alimento. Efectuaram-se comparações entre cada salinidade e o respectivo controlo, através do teste-t, e estas revelam diferenças muito altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre o controlo e as salinidades de 12,5 e 50 psu em cada uma das condições experimentais (Fig. 26).

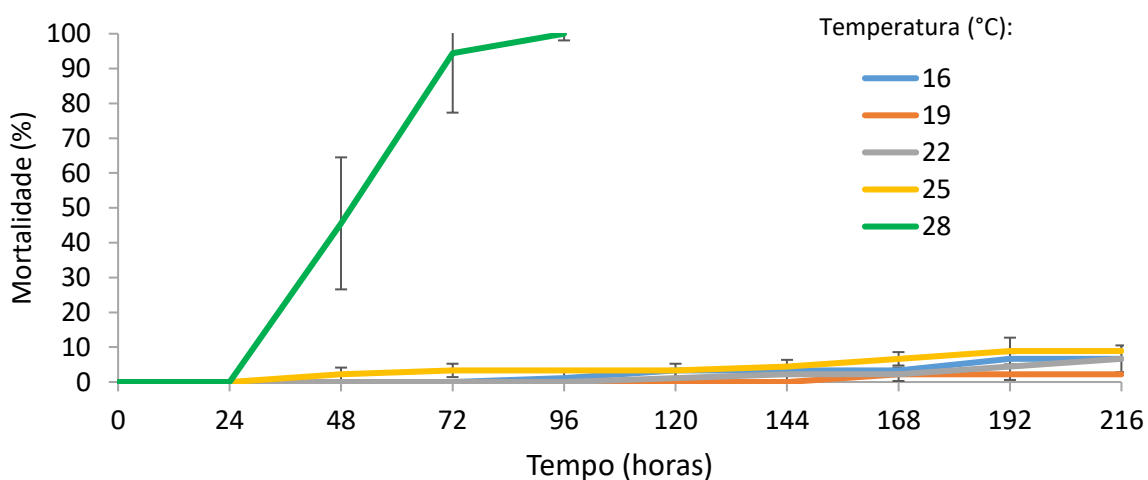


**Figura 26-** Percentagem média de juvenis de *V. corrugata* com as valvas fechadas expostas às salinidades de 30, 12,5 e 50 psu após aclimação com alimento (representado pela letra “A”) e sem alimento (representado pelas letras “NA”) no início da experiência (T=0h). Diferenças significativas \*\*\* $p < 0,001$  em comparação com o respectivo controlo.

Durante este ensaio, foram observados animais com sífões trilhados entre as valvas a partir das 24h de exposição nas salinidades de 12,5 e 50 psu. Este fenómeno teve maior incidência sobre as amêijoas expostas à salinidade de 12,5 psu, independentemente do IC. Ao fim de 3 dias (72h) mais de 30% das amêijoas expostas à salinidade de 12,5 psu, em ambas as condições, tinha os sífões trilhados entre as valvas, enquanto que as amêijoas expostas à salinidade de 50 psu, em ambas as condições, não apresentavam mais de 5%.

### 3.4. Ensaio de temperatura

A figura 27 observa-se mostra os resultados da mortalidade dos animais em função da temperatura e verifica-se que para a temperatura de 28°C a taxa de mortalidade aumenta com o aumento da exposição e todos os animais expostos à mesma morreram ao fim de 4 dias (96h). Para as restantes temperaturas não se observa uma taxa mortalidade superior a 10% para o tempo de exposição.

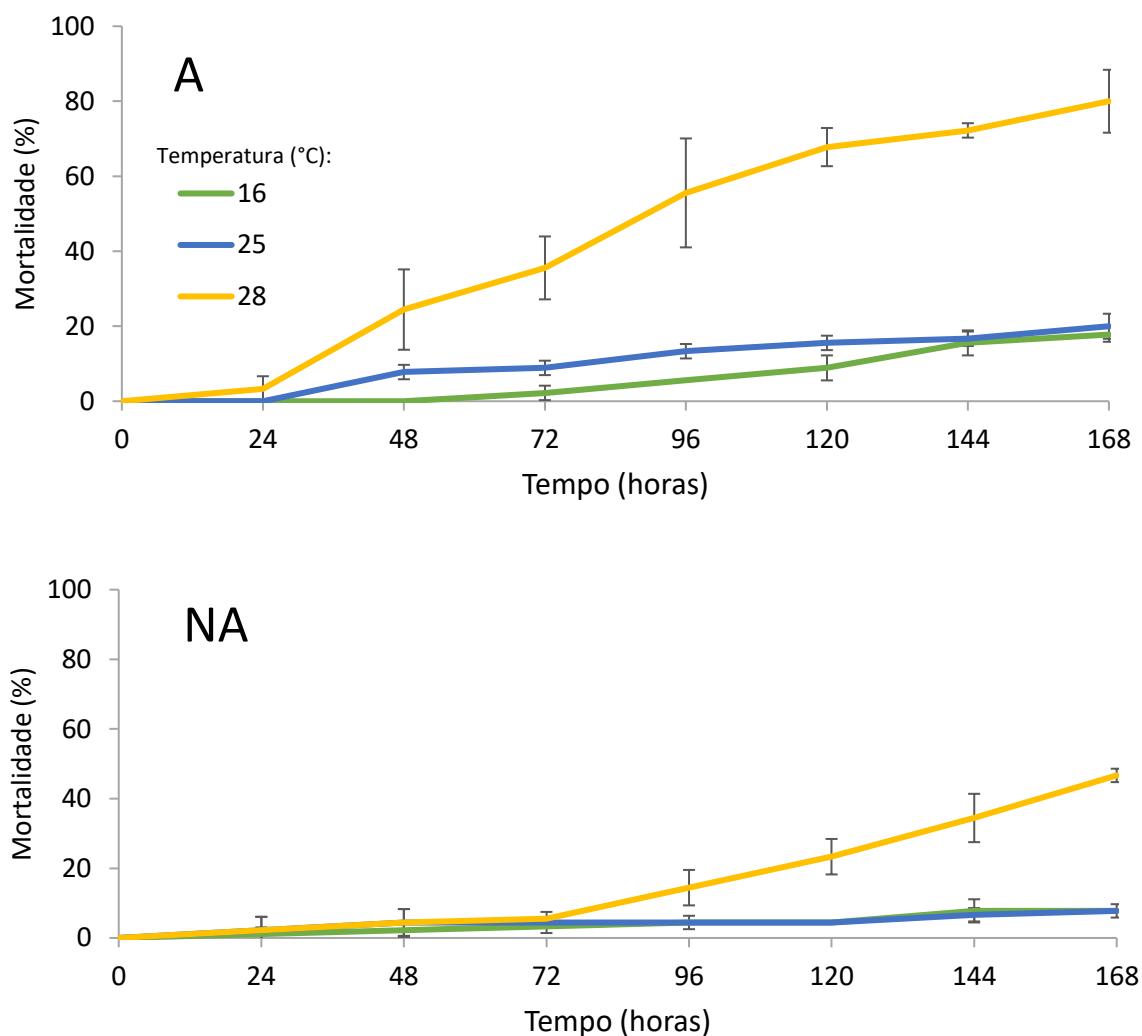


**Figura 27-** Percentagem média de mortalidade de juvenis de *V. corrugata* expostos diferentes temperaturas.

A ANOVA utilizada ao fim de 4 dias (96h) revela que existem diferenças muito altamente significativas ( $F=238,6$ ;  $p<0,001$ ) entre a mortalidade dos animais expostos às diferentes temperaturas. As comparações entre cada temperatura, através do teste de comparações múltiplas de Dunnett's, revelam que há diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre o controlo (16°C) e temperatura de 28°C. Ao fim de 9 dias (216h) não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes temperaturas testadas (excepto a de 28°C para a qual o ensaio terminou mais cedo).

### 3.5. Ensaio de temperatura com diferentes índices de condição

Ao fim de duas semanas de aclimação o IC dos animais alimentados subiu de 11,9% para 12,9%, enquanto que o IC dos animais não alimentados desceu de 11,9% para 11,6%. Os dois lotes de animais utilizados para os ensaios de exposição a diferentes temperaturas apresentaram uma diferença no índice de condição de apenas 1,3%.



**Figura 28-** Percentagem média de mortalidade de juvenis de *V. corrugata* expostos diferentes temperaturas após duas semanas de aclimação com alimento (representado pela letra “A”) e sem alimento (representado pelas letras “NA”).

Durante o período de exposição não se registou 100% de mortalidade em nenhuma temperatura (Fig. 28A e 28NA). Na figura 28A observa-se a mortalidade dos animais alimentados expostos às diferentes temperaturas e, por exemplo, ao fim de uma semana (168h), há uma diferença significativa na mortalidade dos animais expostos às diferentes temperaturas (ANOVA:



F=11,44;  $p<0,01$ ). Ao fim desse tempo, as comparações múltiplas de Dunnett's revelam que há diferenças significativas ( $p<0,01$ ) entre o controlo (16°C) e temperatura de 28°C.

Por outro lado, na figura 28NA observa-se a mortalidade dos animais não alimentados expostos às diferentes temperaturas e ao fim de uma semana (168h), há uma diferença significativa na mortalidade dos animais expostos às diferentes temperaturas (ANOVA: F=10,03;  $p<0,05$ ). Ao fim desse tempo, as comparações múltiplas de Dunnett's revelam que há diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre o controlo (16°C) e temperatura de 28°C.

Após a comparação individual dos tratamentos, alimentadas (A) e não alimentadas (NA), foi comparada a mortalidade dos animais expostos às mesmas temperaturas ao fim de uma semana (168h) em ambos os tratamentos. Apesar das diferenças aparentes observadas na figura 28, o teste-t não detectou diferenças significativas entre as mesmas temperaturas de tratamentos diferentes.

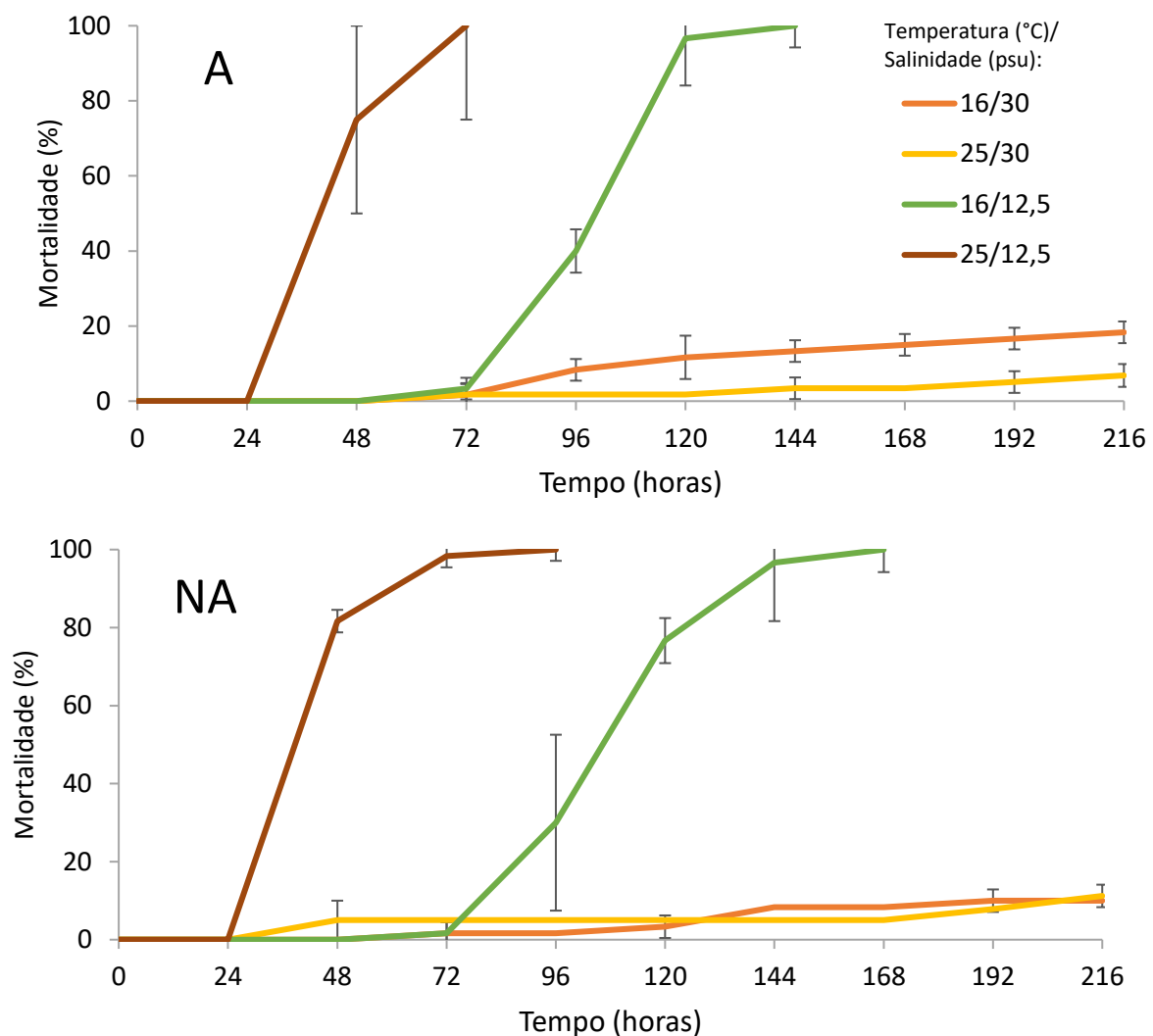
### **3.6. Ensaio de temperatura e salinidade com diferentes índices de condição**

Ao fim de duas semanas de aclimação o IC dos animais alimentados subiu de 10,6% para 12,4%, enquanto que o IC dos animais não alimentados desceu de 10,6% para 9,6%. Os dois lotes de animais utilizados para os ensaios de exposição a diferentes salinidades e temperaturas apresentaram uma diferença no índice de condição de 2,8%.

Para o lote de indivíduos alimentados durante a aclimação verificou-se que todos os indivíduos expostos à salinidade de 12,5 psu e à temperatura de 25°C morreram após 3 dias (72h) de exposição e todos os indivíduos expostos à salinidade de 12,5 psu e à temperatura de 16°C morreram após 6 dias (144h) de exposição (Fig. 29A). Independentemente da temperatura, os animais expostos à salinidade de 30 psu apresentaram ao fim de 9 dias (216h) de exposição uma taxa de mortalidade muito inferior e com um valor inferior a 20%.

Para o lote de indivíduos não alimentados durante a aclimação verificou-se que todos os indivíduos expostos à salinidade de 12,5 psu e à temperatura de 25°C morreram após 4 dias (96h) de exposição e todos os indivíduos expostos à salinidade de 12,5 psu e à temperatura de 16°C morreram após 7 dias (168h) de exposição (Fig. 29NA). Os animais expostos à salinidade de 30 psu apresentaram ao fim de 9 dias (216h) de exposição uma taxa de mortalidade inferior a 15%.

Relativamente ao lote de animais alimentados, os resultados mostram que existe uma interacção muito altamente significativa (Two-way ANOVA: F=116,6;  $p<0,001$ ) entre os factores de temperatura e salinidade ao fim de 3 dias (72h). As comparações múltiplas de Sidak's revelam que existem diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) na mortalidade dos animais expostos à salinidade de 12,5 psu entre as temperaturas testadas (16°C e 25°C). Para a salinidade de 30 psu

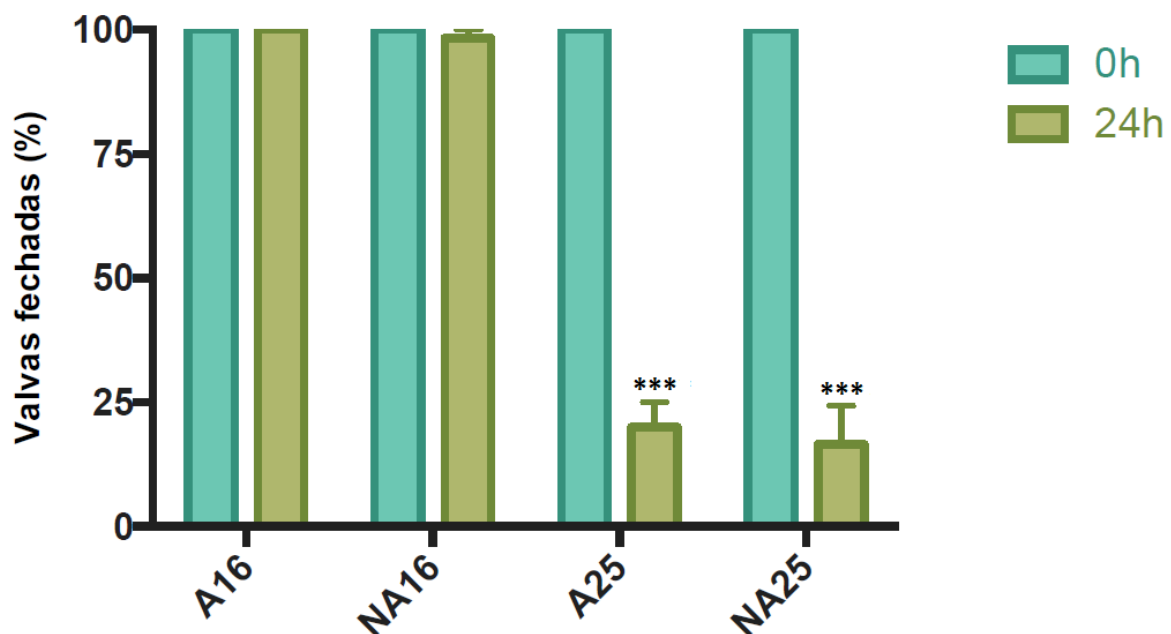


**Figura 29-** Percentagem média de mortalidade de juvenis de *V. corrugata* expostos diferentes temperaturas e salinidades após duas semanas de aclimação com alimento (representado pela letra “A”) e sem alimento (representado pelas letras “NA”).

não se verificam diferenças estatísticas significativas entre a mortalidade das duas temperaturas testadas. Ao fim de 6 dias (144h) de exposição verifica-se a salinidade é o único factor que influencia significativamente (Two-way ANOVA:  $F=512,6$ ;  $p<0,001$ ) a taxa de mortalidade dos animais alimentados expostos às diferentes temperaturas e salinidades. As comparações múltiplas de Sidak’s revelam que existem diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre a taxa de mortalidade dos animais expostos à salinidade de 12,5 psu e temperatura de 16°C e dos animais expostos a salinidade de 30 psu e temperaturas de 16 e 25°C. Ao fim de 9 dias (216h) não se verificam diferenças significativas entre a taxa de mortalidade dos animais expostos à salinidade de 30 psu, independentemente da temperatura.

Relativamente ao lote de animais não alimentados, os resultados mostram que existe uma interacção altamente significativa (Two-way ANOVA:  $F=18,26$ ;  $p<0,01$ ) entre os factores de temperatura e salinidade ao fim de 4 dias (96h) de exposição. As comparações múltiplas de Sidak's revelam que existem diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre a mortalidade dos animais expostos à salinidade de 12,5 psu e temperatura 25°C e a mortalidade dos animais expostos aos restantes tratamentos. Ao fim de uma semana (168h) de exposição verificou-se que a salinidade é o único factor que influencia significativamente (Two-way ANOVA:  $F=578,3$ ;  $p<0,001$ ) a taxa de mortalidade dos animais alimentados expostos às diferentes temperaturas e salinidades. As comparações múltiplas de Sidak's revelam que existem diferenças muito altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre a mortalidade dos animais expostos a salinidade de 12,5 psu e temperatura 16°C e os animais expostos a salinidade de 30 e temperaturas de 16 e 25°C. Ao fim de 9 dias (216h) não se verificam diferenças significativas entre a taxa de mortalidade dos animais expostos à salinidade de 30 psu, independentemente da temperatura.

Após a comparação individual dos tratamentos, alimentadas (A) e não alimentadas (NA), foram realizados testes-t com o objectivo de comparar a mortalidade dos animais expostos às mesmas temperaturas e salinidades ao fim do mesmo intervalo de tempo em ambos os



**Figura 30-** Percentagem média de juvenis de *V. corrugata* com as valvas fechadas expostas à salinidade de 12,5 psu e temperatura de 16 e 25°C após aclimação com (representado pela letra “A”) e sem alimento (representado pelas letras “NA”) no início da experiência (T=0h) e após 24h de exposição. Diferenças significativas \*\*\* $p<0,001$  em comparação com o respectivo tratamento no instante inicial (0h).

tratamentos. Os resultados revelam que não existem diferenças significativas na mortalidade dos animais expostos às mesmas condições de temperatura e salinidade entre os dois tratamentos.

Todas as amêijoas expostas à salinidade de 12,5 psu fecharam as valvas imediatamente após a sua colocação na água, independentemente da temperatura e do seu índice de condição (Fig. 30). Para esta salinidade efectuaram-se comparações entre o instante inicial, 0h, e as 24h de exposição em cada condição: A16 (alimentadas a 16°C), NA16 (não alimentadas a 16°C), A25 (alimentadas a 25°C) e NA25 (não alimentadas a 25°C). O resultado dos testes-t revelam diferenças muito altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre o instante inicial, 0h, e as 24h de exposição para os animais alimentados a 25°C e para os animais não alimentados a 25°C (Fig. 30). Os animais expostos à temperatura 16°C, independentemente do IC, mantiveram as valvas fechadas ao fim de 24h de exposição à salinidade de 12,5 psu.

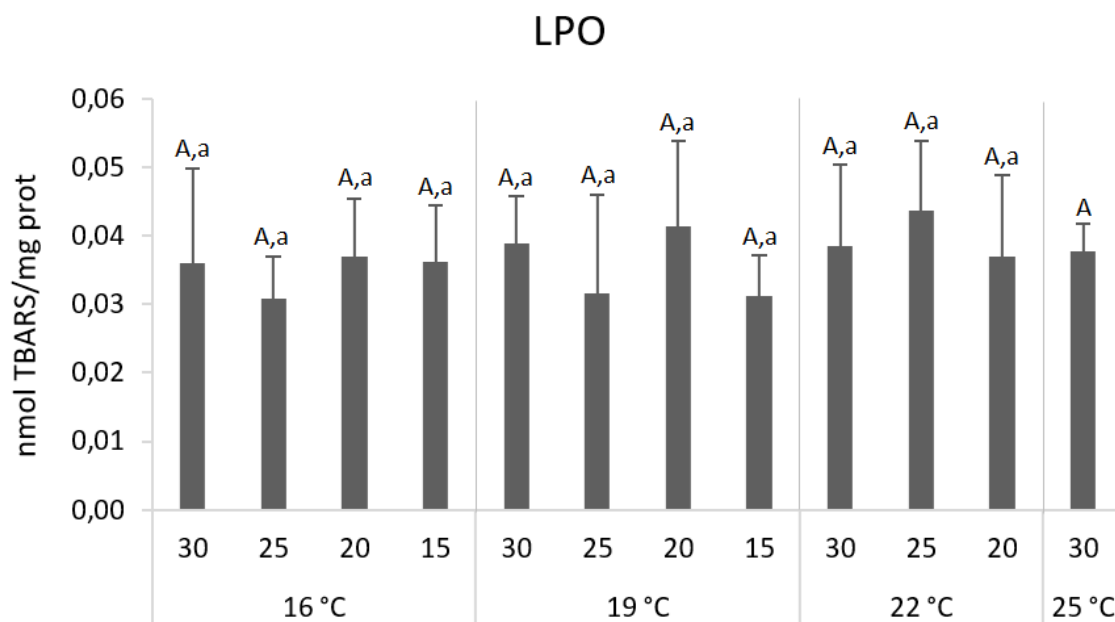
Foram observados animais com sífões trilhados entre as valvas (Fig. 31) ao fim de 24h de exposição na salinidade de 12,5 psu e temperatura 25°C em ambas as condições experimentais (alimentadas e não alimentadas) e ao fim de 48h de exposição na salinidade de 12,5 psu e temperatura de 16°C em ambas as condições experimentais (alimentadas e não alimentadas).



**Figura 31-** Juvenil de *V. corrugata* com os sífões trilhados entre valvas após 48h de exposição à salinidade de 12,5 psu e temperatura de 16°C.

### 3.7. Stresse oxidativo

Relativamente à peroxidação lipídica (LPO) não se verificaram diferenças significativas entre temperaturas nem entre salinidades ao fim de 16 dias de exposição, no entanto confirma-se que houve dano lipídico nas células dos juvenis de *V. corrugata* em todos os tratamentos (Fig. 32). Os valores da peroxidação lipídica variaram entre 0,03 e 0,04 nmol TBARS/mg proteína.

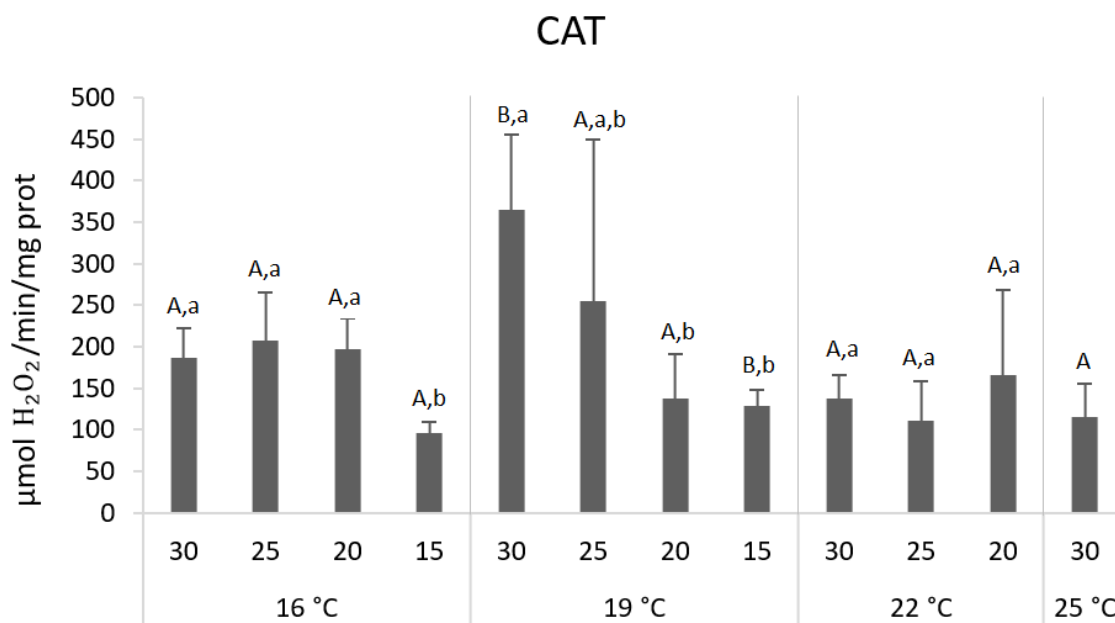


**Figura 32-** Peroxidação lipídica em juvenis de *V. corrugata* expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 16 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre condições, enquanto que letras iguais não representam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre condições. Letras minúsculas representam comparações entre salinidades da mesma temperatura, enquanto que letras maiúsculas representam comparações entre temperaturas da mesma salinidade.

Na actividade da enzima catalase (CAT) (Fig. 33) verificaram-se diferenças muito altamente significativas (ANOVA:  $F=10,307$ ;  $p < 0,001$ ) entre os diferentes valores de salinidade à temperatura de 16°C e diferenças muito significativas (ANOVA:  $F=5,486$ ;  $p < 0,01$ ) entre os diferentes valores de salinidade à temperatura de 19°C, sendo que os animais expostos à salinidade de 15 psu e temperatura de 16°C apresentam o menor valor de actividade da CAT (96  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /minuto/mg proteína) ao fim de 16 dias de exposição, e os animais expostos à salinidade de 30 psu e temperatura 19°C apresentam o maior valor de actividade da CAT (365  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /minuto/mg proteína) ao fim de 16 dias de exposição. Para a temperatura de 22°C não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na actividade da CAT entre os diferentes valores de salinidade. Analisando as temperaturas, verificaram-se diferenças muito altamente significativas (ANOVA: 25,674;  $p < 0,001$ ) entre a actividade da CAT nos diferentes valores de temperatura na salinidade de 30 psu e diferenças altamente significativas entre a actividade da catalase nos diferentes valores de temperatura na salinidade de 15 psu (teste-t:  $F=1,233$ ;  $p < 0,01$ ). Para as salinidades de 25, 20 psu não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes temperaturas.

Na actividade da glutathione-S-transferase (GST) (Fig. 34) verificaram-se diferenças altamente significativas (ANOVA: 6,425;  $p < 0,01$ ) entre os diferentes valores de salinidade à temperatura de 16°C. Para as temperaturas de 19 e 22°C não se verificaram diferenças significativas

entre a actividade da GST nos diferentes valores de salinidade. Verificam-se também diferenças muito altamente significativas (ANOVA:  $F=20,029$ ;  $p<0,001$ ) entre os diferentes valores de temperatura na salinidade de 25 psu. Para as salinidades de 30, 20 e 15 não se verificaram

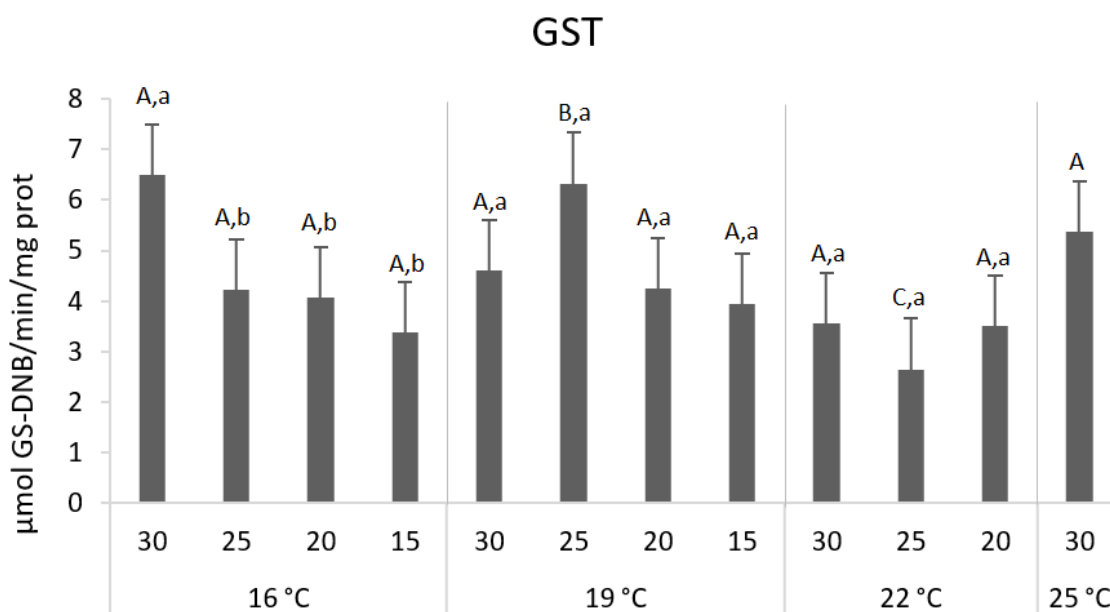


**Figura 33-** Actividade da CAT em juvenis de *V. corrugata* expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 16 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p\leq 0,05$ ) entre condições, enquanto que letras iguais não representam diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre condições. Letras minúsculas representam comparações entre salinidades da mesma temperatura, enquanto que letras maiúsculas representam comparações entre temperaturas da mesma salinidade.

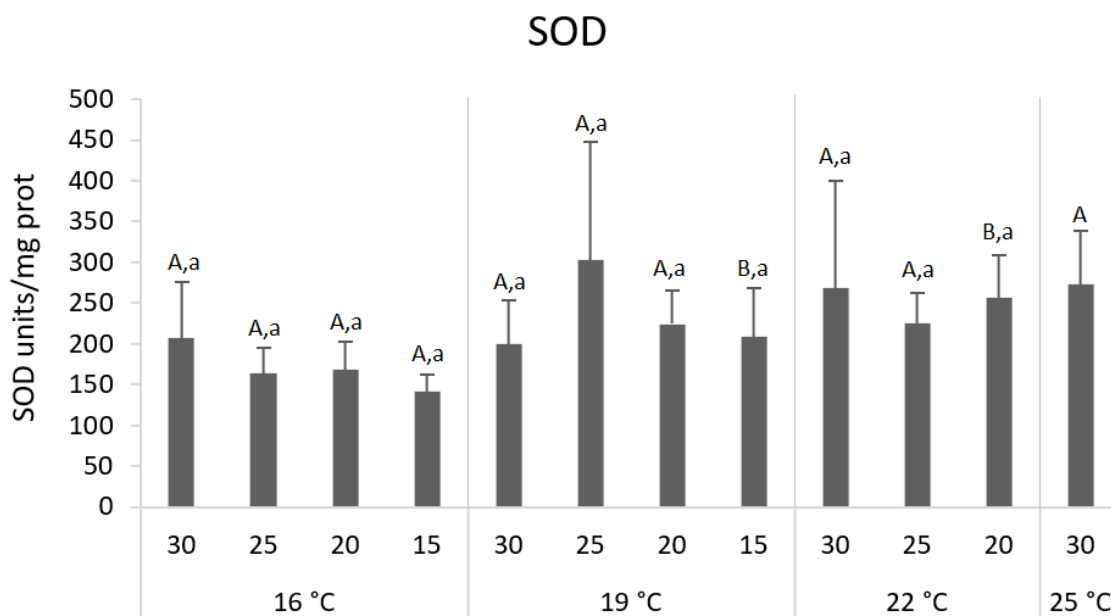
diferenças significativas entre as diferentes temperaturas. Os animais expostos à salinidade de 25 psu e temperatura de 22°C apresentam o menor valor de actividade da GST (2,7μmol GS-DNB/minuto/mg proteína) ao fim de 16 dias de exposição, e os animais expostos à salinidade de 30 psu e temperatura 16°C apresentam o maior valor de actividade da GST (6,5μmol GS-DNB/minuto/mg proteína) ao fim de 16 dias de exposição.

Relativamente à actividade da enzima superóxido dismutase (SOD) não se verificaram diferenças significativas entre os valores de salinidade em cada temperatura ao fim de 16 dias de exposição (Fig. 35). No entanto, verificam-se diferenças significativas (ANOVA:  $F=6,070$ ;  $p<0,05$ ) entre a actividade da SOD nas diferentes temperaturas para a salinidade de 20 psu e diferenças significativas para a salinidade de 15 psu (teste-t  $F=9,135$ ;  $p<0,05$ ). Para as salinidades de 30 e 25 não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as temperaturas testadas. Os valores mais baixos da actividade da SOD foram observados na temperatura de 16°C ( $<207$  SOD

units/mg proteína) e o valor mais elevado da actividade desta enzima observou-se na salinidade de 25 psu e temperatura 19°C (303 SOD units/mg proteína).



**Figura 34-** Actividade da GST em juvenis de *V. corrugata* expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 16 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre condições, enquanto que letras iguais não representam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre condições. Letras minúsculas representam comparações entre salinidades da mesma temperatura, enquanto que letras maiúsculas representam comparações entre temperaturas da mesma salinidade.



**Figura 35-** Actividade da SOD em juvenis de *V. corrugata* expostos a diferentes salinidades e temperaturas ao fim de 16 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre condições, enquanto que letras iguais não representam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre condições. Letras minúsculas representam comparações entre salinidades da mesma temperatura, enquanto que letras maiúsculas representam comparações entre temperaturas da mesma salinidade.

Só foi possível realizar uma ANOVA de dois factores (a mais adequada para este tipo de dados) para cada biomarcador no caso das temperaturas de 16 e 19°C. Para a CAT, o resultado do teste mostrou uma interacção significativa ( $F=4,019$ ;  $p<0,05$ ) entre os factores de temperatura e salinidade. Para a SOD, o resultado do teste mostrou ser apenas significativo ( $F=10,513$ ;  $p<0,01$ ) para o factor temperatura. Para a GST e LPO o resultado do teste não foi significativo.



## Capítulo 4- Discussão

#### 4.1. Índice de condição

O índice de condição é um índice muito utilizado e altamente recomendado em aquacultura de bivalves devido à sua facilidade de medição, de validação (Lucas & Beninger 1985) e à sua fácil compreensão (Filgueira et al. 2013). Este índice permite uma avaliação do estado de nutrição do *stock* em produção, contribuindo para se ter uma ideia do nível das reservas energéticas que os indivíduos podem disponibilizar para o crescimento e reprodução, ou para fazer face a factores de stress que possam surgir durante o seu cultivo (Lucas & Beninger 1985).

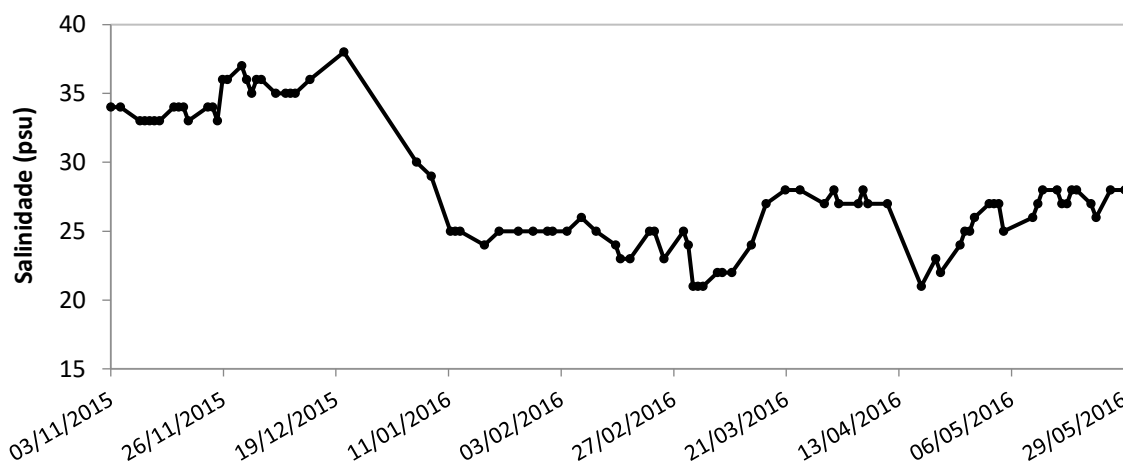
Condições ambientais desfavoráveis, nomeadamente, ao nível da temperatura e salinidade, podem reduzir o valor do índice de condição dos animais (Pedicord 1977), uma vez que estes requerem um maior esforço energético para manter as funções metabólicas. O mesmo se aplica à ocorrência de doenças ou à produção e libertação de gâmetas em época de reprodução (Lucas & Beninger 1985). A variação sazonal da disponibilidade de alimento é, obviamente, um factor determinante para o valor de IC em cada momento.

Os resultados obtidos neste trabalho, considerando globalmente as três espécies estudadas, indicaram que há diferenças no IC em função do local, época do ano e comprimento dos animais. Isto acontece porque o IC depende da interacção de diversos factores como a taxa metabólica, disponibilidade de alimento, crescimento e reprodução, por sua vez dependentes de factores abióticos (ex.: temperatura, fotoperíodo, salinidade, etc.) que variam com o local e estação do ano, e o estágio de desenvolvimento dos animais (ex.: juvenis *versus* adultos) (Yildiz et al. 2006). Existem, também, duas tendências que se mostraram mais ou menos evidentes para todas as espécies analisadas: em Maio o IC dos juvenis é superior do que em Janeiro, enquanto que esta relação tende a ser inversa (embora nem sempre) nos adultos. Esta tendência está relacionada com o início da época reprodutiva, que para estas espécies começa em Maio/Junho e se prolonga até ao final do verão (André & Lindegarth 1995; Da Ros et al. 1985; Aníbal et al. 2011). Aníbal et al. (2011) mostra que para amêijoia-boia *Ruditapes decussatus* há um aumento do valor do IC desde Janeiro a Junho, associado com o desenvolvimento e maturação das gónadas, seguida de uma descida acentuada deste valor coincidente com a libertação dos gâmetas na época reprodutiva, concluindo que o IC dos adultos está correlacionado com o seu ciclo reprodutivo. Como só os animais adultos estão envolvidos na reprodução, só estes exibirão uma diminuição do IC aquando a emissão dos gâmetas. Por outro lado, os juvenis (o foco principal deste trabalho) tendem a aumentar o IC em Maio em virtude da maior disponibilidade de alimento, o qual se mantém alto por não estarem envolvidos na reprodução. Os resultados obtidos foram úteis para perceber que

os valores de IC dos bivalves podem variar em função de vários factores e que para os ensaios a realizar na restante dissertação será possível manipular o valor de IC mediante fornecimento/não fornecimento de alimento em juvenis, sem que haja interferência de fenómenos relacionados com a reprodução. Da mesma forma, foi possível perceber que os valores de IC de *V. corrugata* utilizada nos ensaios (no intervalo de 9,1-13,8%) não se afastam muito dos valores encontrados para populações desta e doutras espécies de bivalves na região de Aveiro. Esta informação é pertinente na medida em que, ao utilizarem-se nos ensaios animais provenientes de maternidades e que, portanto, se desenvolveram em condições artificiais, o IC poderia ser muito diferente do encontrado em populações naturais – facto que não se verificou. Todavia, os valores de IC dos animais utilizados nos ensaios nunca foram tão baixos como os observados na empresa de aquacultura em 2016 (7,9-9,3%) aquando da ocorrência de valores elevados de mortalidade.

## 4.2. Salinidade

A salinidade é um factor ambiental determinante para organismos aquáticos e decisivo na sua distribuição espacial em sistemas estuarinos (Nie et al. 2017). Nos estuários, os níveis de salinidade podem apresentar variações diárias e sazonais (Fig. 36) (Hauton 2016) de origem natural (ex.: marés ou precipitação) ou, mais pontualmente, antropogénica (ex.: descargas industriais ou actividades salícolas) (Bertrand et al. 2017). Os padrões de salinidade que os estuários apresentam resultam também da interacção de outros factores como a morfologia e a topografia do estuário e a altura que a água alcança durante os picos de maré (Mohammed & Scholz 2017).



**Figura 36-** Variação sazonal de salinidade num dos tanques de aquacultura da empresa de aquacultura na Ria de Aveiro durante o estágio (4º ano de licenciatura) realizado no ano lectivo de 2015/2016.

As espécies que habitam sistemas estuarinos, como é o caso da amêijoia-macha, são maioritariamente eurihalinas, espécies que possuem adaptações fisiológicas para suportarem

variações de salinidade, apresentando um intervalo de tolerância de larga gama, embora bem definido. O presente trabalho demonstrou que a amêijoa-macha sobreviveu a um intervalo de salinidades entre 17,5 e 45 psu durante alguns dias, o que parece corroborar que se trata de uma espécie eurihalina. No entanto, apesar da tolerância que estas espécies apresentam, sabe-se que a exposição a valores extremos de salinidade provocam stresse fisiológico nos organismos que pode conduzir à sua morte (Verdelhos et al. 2015). Os resultados obtidos nesta dissertação apontam para que valores de salinidade baixa (10, 12,5 e 15 psu) e alta (47,5 e 50 psu) provocam mortalidade nesta espécie a partir de um curto intervalo de tempo (3 dias). Para perceber melhor como este factor pode ser letal nestas condições, é necessário compreender que as espécies estuarinas apresentam várias formas de ajuste osmótico perante variações de salinidade, podendo estas variar desde a osmoconformação completa à osmorregulação completa; os organismos osmoconformantes mantêm a concentração osmótica dos fluídos extracelulares semelhante à do meio envolvente (organismos poiquilosmóticos), enquanto que a osmorregulação caracteriza-se pela capacidade do organismo regular a concentração osmótica dos fluídos extracelulares independentemente da concentração osmótica externa (organismos homeosmóticos) (Hauton 2016).

A maioria dos bivalves eurihalinos, como parece ser o caso da amêijoa-macha, são osmoconformantes (Parker et al. 2017; Hauton 2016). Shumway (1977), demonstrou que a concentração dos iões  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  na hemolinfa de várias espécies de bivalves estuarinos, nomeadamente *Modiolus modiolus*, *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas* e *Scrobicularia plana*, seguiam a mesma concentração que o meio externo sempre que os animais mantinham as valvas abertas, mostrando que estas espécies são osmoconformantes.

Para sobreviver em ambientes tão desafiantes como os estuários, é essencial que apresentem uma boa regulação do volume celular e da homeostase da composição iónica, que requer dispêndio de energia (Parker et al. 2017). Por exemplo, para prevenir o aumento do volume celular durante exposições agudas a salinidades baixas, os organismos osmoconformantes podem libertar aminoácidos livres a partir de proteínas intracelulares para a hemolinfa, no sentido de restaurar a pressão osmótica de cada lado da membrana citoplasmática (Hosoi et al. 2003).

Para além das adaptações fisiológicas, os bivalves apresentam também estratégias comportamentais perante o stresse salino através do enterramento no substrato ou do fecho das valvas (Berger & Kharazova 1997; Riisgård et al. 2014; Hauton 2016), mantendo uma salinidade óptima no líquido intra-valvar (Kim et al. 2001). Esta estratégia pode causar privação de oxigénio devido à interrupção da circulação da água, com consequente uso de vias metabólicas anaeróbicas

(Kim et al. 2001), o que pode provocar redução da taxa de alimentação e de crescimento dos animais (Hauton 2016).

Quando, no presente trabalho, a amêijoia-macha foi exposta a salinidades baixas extremas (10, 12,5 e 15 psu), a taxa de mortalidade aumentou em poucos dias. Este fenómeno está relacionado com o equilíbrio osmótico entre as células e o meio. Quando o meio onde os indivíduos estão inseridos é hipossalino, ou seja, há maior quantidade de solutos no interior das células do que na hemolinfa, há uma movimentação de água para o interior das células e organelos de modo a alcançar-se o equilíbrio osmótico, causando turgescência ou mesmo ruptura de organelos ou da célula. Mesmo quando este fenómeno não ocorre, o elevado custo energético requerido para manter o equilíbrio osmótico pode conduzir à morte dos indivíduos, desta forma, vários organismos marinhos, nomeadamente bivalves, apresentam dificuldade em sobreviver em salinidades muito baixas (Verdelhos et al. 2015; Taylor et al. 2017; Carregosa, Figueira, et al. 2014). Uma vez que o custo energético deste processo pode ser determinante para a sobrevivência, o IC é um aspecto que pode influenciar a maior ou menor mortalidade nestas circunstâncias, razão porque foi tido em consideração neste estudo (ver adiante).

Da mesma forma, quando esta espécie foi exposta a salinidades altas extremas (47,5 e 50 psu), a taxa de mortalidade aumentou rapidamente a partir das 48h e alcançou os 100% de mortalidade na salinidade de 50 psu ao fim de 6 dias. Neste caso, sendo o meio hipersalino, há maior quantidade de solutos na hemolinfa em comparação com o meio intracelular. Desta forma, há um movimento de água do interior das células para o meio e, consequentemente, plasmólise e danos metabólicos nas células. Quando prolongados, estes danos podem ser irreversíveis causando a morte dos animais, no entanto, estes valores de salinidade raramente se verificam nos ambientes estuarinos portugueses. Sendo o objectivo deste ensaio perceber a toxicidade das salinidades altas quando estas estão em contacto com a amêijoia-macha, sugere-se o uso pontual de água salinizada durante a estação das chuvas num caso de emergência, para manter nos tanques de cultura uma salinidade que apresente um perigo menor para a sobrevivência da espécie. Essa água não pode ultrapassar os 45 psu e o ideal é manter-se nos 40 psu, uma vez que a mortalidade observada para a salinidade de 45 psu e 40 psu ao fim de 6 dias de exposição foi de 23% e 8%, respectivamente. No entanto, assim que ambas as salinidades se misturarem, a salinidade final não será tão alta. Ainda que o volume de água necessário para este procedimento seja considerável, o único custo envolvido seria do sal, uma vez que este processo seria efectuado no canal de admissão de água (antes desta entrar nos tanques de cultivo) com água salobra natural. Por exemplo, para elevar a salinidade de 15 para 20 psu, com água a 40 psu, num tanque de cultivo com 3750m<sup>3</sup>

(50mx50mx1,5m) seriam necessárias adicionar 18,75 ton de sal a um volume de 750 kL, obtendo-se uma renovação de água de 20%.

As diferenças na mortalidade verificadas para a salinidade de 12,5 e 15 psu entre ambos os tratamentos (choque e gradual) para o mesmo tempo de exposição revelam a importância da transição salina gradual que estes animais necessitam para melhorar o seu desempenho perante stress salino. As salinidades de 15 e 12,5 psu apresentaram uma taxa de mortalidade de 60% e 98%, respectivamente, após 6 dias (144h) de exposição no tratamento de choque. Para o mesmo tempo de exposição a estas salinidades no tratamento gradual a taxa de mortalidade foi de 5% e 77%, respectivamente. Este factor também se aplica ao transporte de animais entre estabelecimentos de produção em aquacultura ou à chegada de animais das maternidades, devendo ser aclimatados e com uma transição gradual de salinidade caso esta seja diferente entre o local de origem e o local de destino dos animais.

Como previsto, ambos os tratamentos de choque mostraram uma maior e mais rápida mortalidade do que os tratamentos graduais para as mesmas concentrações salinas. Para além da mortalidade, a exposição crónica a salinidades inferiores a 15 psu não permite a recuperação normal da actividade metabólica dos organismos (Kim et al. 2001), provocando às amêijoas uma maior susceptibilidade a qualquer tipo de pós-stresse. É evidente que este factor ambiental influencia o desempenho fisiológico deste bivalve (Hauton 2016) e esta disrupção pode tornar-se maior uma vez que as projecções de alterações climáticas para Portugal até ao final do século revelam que, apesar de uma diminuição na precipitação total, eventos de precipitação extrema vão ocorrer com maior frequência no inverno e na primavera, contribuindo para uma descida ainda mais acentuada da salinidade (Costa et al. 2012).

*V. corrugata* apresentou sensibilidade para salinidades baixas extremas (10, 12,5 e 15 psu) e salinidades altas extremas (47,5 e 50 psu) após alguns dias de exposição. No tratamento de choque, os indivíduos responderam a esta mudança abrupta na salinidade através do fecho das valvas, conduzindo a uma redução da sua mobilidade e actividade valvar. Outros estudos com moluscos bivalves também evidenciam esta estratégia, nomeadamente a espécie *Anadara trapezia* e *Trapezium liratum* que fecham as valvas a salinidades inferiores a 15 psu (Taylor et al. 2017; Kurihara 2017). Da mesma forma, no ensaio de salinidades com diferentes IC, os animais expostos à salinidade de 12,5 psu fecharam as valvas imediatamente após o primeiro contacto com esta água. O IC não influenciou este fenómeno uma vez que todos os animais expostos a 12,5 psu fecharam as valvas.

O aparecimento de sífões trilhados entre as valvas (Fig. 24) durante a exposição a salinidades altas, baixas e com diferentes IC foi também observado. Este fenómeno caracteriza-se pelo fechamento das valvas do animal sem que os sífões sejam recolhidos e não se encontrou na literatura qualquer referência a este fenómeno, sendo aqui descrito pela primeira vez. Esta situação foi observada nos tanques de aquacultura da empresa de aquacultura em 2016, nomeadamente no mês de Abril aquando o início do aumento de mortalidade.

Quando fecham as valvas perante stresse salino, os bivalves iniciam vias metabólicas anaeróbias. Embora durante um período de tempo os bivalves não precisem fazer uma troca de água para manter os níveis de oxigénio, a mudança de água é necessária para remover produtos de excreção prejudiciais (ex.: amónia) (Taylor et al. 2017). Por essa razão, o fechamento das valvas pode ser uma estratégia eficiente para o animal se proteger de condições salinas adversas por curtos períodos de tempo, mas conduzirá a uma situação de stresse insuportável por maiores períodos de tempo, que conduzirá inevitavelmente à morte do animal caso se mantenha por muito tempo, como observado nas experiências conduzidas neste trabalho.

Uma vez que o baixo IC tem tendência para diminuir a resistência desta espécie perante o stresse salino, admitiu-se que este pudesse ter contribuído para a mortalidade observada em Abril de 2016 na empresa de aquacultura na Ria de Aveiro. Os resultados indicam que, para uma salinidade de 30 psu, um IC mais baixo influencia negativamente a sobrevivência dos animais ao fim de 10 dias (240h), mas relativamente à salinidade mais baixa (12,5 psu) e com maior interesse neste estudo, ao fim de 4 dias (96h) de exposição, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a mortalidade das amêijoas com diferentes IC. Observou-se, no entanto, ao fim de 4 dias (96h) uma taxa de mortalidade maior na condição dos animais não alimentados (87%) do que nos animais alimentados (74%), contudo, ao fim de 5 dias (120h) ambas as taxas de mortalidade na salinidade de 12,5 psu alcançaram os 100%. Sendo este um índice de fácil medição e compreensão (Lucas & Beninger 1985), revela-se importante monitorizar para determinar a qualidade da cultura produzida e avaliar o desempenho dos indivíduos da cultura perante condições ambientais menos favoráveis.

### **4.3. Temperatura**

A temperatura é dos factores ambientais mais estudados no contexto da fisiologia e ecologia de animais aquáticos (Cairns et al. 1975). Esta mostra ser o factor principal que justifica a distribuição em profundidade e latitudinal das espécies (Parker et al. 2017), podendo apresentar fortes flutuações diárias e sazonais. A temperatura apresenta elevada influência no controlo

metabólico e processos biológicos de bivalves, nomeadamente na alimentação, crescimento, respiração (Parker et al. 2017; Nie et al. 2017) e taxa de filtração (Nie et al. 2017), e sabe-se que as temperaturas mais altas, que ocorrem na primavera e verão em países temperados da costa Atlântica europeia, aceleram a maioria desses processos (Albentosa et al. 1994).

Sendo a temperatura facilmente medida no campo e estabelecida em situações experimentais (Cairns et al. 1975), é possível determinar o intervalo de tolerância térmico das espécies e este permite antecipar os impactes ecológicos e económicos quando o limite de tolerância da espécie é ultrapassado (Le et al. 2017). O aumento da temperatura associado à sobre-exploração da amêijoia-macha nos estuários pode originar uma grande e rápida mudança na abundância desta espécie e levar ao seu desaparecimento de algumas áreas importantes e, sendo a amêijoia-macha uma espécie de elevado valor comercial em Portugal, esta situação pode conduzir a consequências económicas relevantes nestas regiões do país.

As amêijoas são uma parte importante da produção aquícola e representam actualmente cerca de 25% de toda a produção. Como animais estuarinos estão sujeitas às variações diárias e sazonais de temperatura, sendo que em tanques de aquacultura pode atingir valores muito elevados (na empresa de aquacultura em questão, pode ultrapassar os 26°C em alguns picos diários durante a primavera/verão). Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que a amêijoia-macha sobreviveu a temperaturas na água até 25°C durante 9 dias de exposição. No entanto, o crescimento da amêijoia-macha, como organismo poiquilotérmico, está principalmente dependente da temperatura ambiente (Le et al. 2017). Sabe-se que a temperatura óptima de crescimento deste bivalve é 20°C e que temperaturas superiores provocam uma diminuição da taxa de ingestão e eficiência de absorção e um aumento da taxa de respiração e excreção. Este aumento provoca perdas de energia e, como consequência, há diminuição da eficiência de crescimento (Albentosa et al. 1994). Desta forma Albentosa et al. (1994) mostra que para um indivíduo crescer de 1 a 5 mm levará 20 dias a uma temperatura de 20°C, 1 mês a 25°C, 2 meses a 15°C e 5 meses a 10°C.

A tolerância à temperatura varia entre diferentes espécies, mas pode também variar dentro da mesma espécie dependendo do regime de temperatura a que os organismos estão expostos. Como referido anteriormente, os dois principais factores que influenciam a variação da tolerância termal intraespecífica são a latitude e a profundidade (Sobral & Widdows 1997). Para além dos factores espaciais, a tolerância à temperatura pode variar consoante o tamanho do organismo, o seu nível metabólico, actividade reprodutora, valores de temperatura a que esteve exposto anteriormente, a sua capacidade de adaptação e ao tempo de exposição ao stresse térmico (Sobral



& Widdows 1997). Sabe-se também que os indivíduos juvenis tendem a apresentar um intervalo mais estreito de tolerância e resistem a pressões ambientais com mais dificuldade que os indivíduos adultos (Cairns et al. 1975).

No presente trabalho, a temperatura de 28°C mostrou ser letal para a amêijoia-macha a partir das 48h de exposição. A mortalidade verificada nesta temperatura pode estar relacionada com diversos factores, nomeadamente anoxia nos tecidos dos organismos, a falha nos processos de regulação osmótica, alteração molecular nas enzimas e lípidos membranares e desnaturação de proteínas (Cairns et al. 1975). Além disso, estando os indivíduos a ser produzidos em silos suspensos na água, não têm possibilidade de se enterrar no sedimento para evitar as temperaturas altas.

Mais uma vez, admitiu-se que o baixo IC pudesse ter contribuído para a mortalidade observada em Abril de 2016 na empresa de aquacultura, sendo que tem potencial para diminuir o desempenho desta espécie perante stresse térmico. No entanto, os resultados indicam que a temperatura de 28°C provocou mortalidade em ambas as condições experimentais (80% na condição “alimentados” e 47% na condição “não alimentados”), ou seja, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a mortalidade observada na condição “alimentados” e na condição “não alimentados”. É de salientar, no entanto, que a diferença no índice de condição obtido foi apenas de 1,3% - o que torna o ensaio pouco expressivo relativamente a este aspecto. Em ensaios futuros o período de aclimação com fornecimento/não fornecimento de alimento deve ser maior para diferenciar melhor o IC entre tratamentos.

Com a subida global da temperatura e o aumento de eventos extremos de precipitação previstos para Portugal com as alterações climáticas (IPCC 2013; Costa et al. 2012), a elevada mortalidade observada na empresa entre Abril e Maio de 2016 pode passar a ser um evento frequente em regime de aquacultura semi-intensivo com produção de bivalves em suspensão.

Os resultados do ensaio com diferentes temperaturas, salinidades e IC mostraram que, em ambas as condições experimentais (alimentados e não alimentados) existe uma interacção significativa entre a salinidade e a temperatura ao fim de 3 dias (72h) quando alimentadas, e ao fim de 4 dias (96h) quando não alimentadas. A conjugação da salinidade de 12,5 psu e da temperatura de 25°C mostrou ser o factor mais importante para o aumento da taxa de mortalidade a curto prazo. A diferença no IC não influenciou a taxa de mortalidade.

Verificou-se que, independentemente da diferença no IC, o primeiro conjunto de animais a alcançar os 100% de mortalidade foram os expostos à salinidade de 12,5 psu e temperatura de 25°C, seguidos dos animais expostos à salinidade de 12,5 psu e à temperatura de 16°C. Assim, verifica-se que quando a salinidade é baixa, o aumento de temperatura potencia o aumento da taxa

de mortalidade da amêijoa-macha, tornando-a mais rápida e acentuada quando comparada com uma temperatura mais baixa. Este resultado pode justificar elevados valores de mortalidade observados na empresa entre Abril e Maio de 2016, quando uma descida na salinidade da água coincidiu com um aumento acentuado na temperatura da água dos tanques de cultivo. Neste ensaio em concreto, o aumento da taxa de mortalidade dos indivíduos expostos à salinidade de 12,5 psu e temperatura de 25°C comparado com a taxa de mortalidade dos indivíduos expostos à salinidade de 12,5 psu e à temperatura de 16°C pode também estar relacionado com a eficiência do fechamento das valvas dos animais. O presente trabalho demonstrou que os animais expostos à temperatura de 25°C nas diferentes condições (alimentados e não alimentados) tornaram-se incapazes de manter as valvas fechadas à salinidade de 12,5 psu ao fim de 24h de exposição comparativamente com os animais expostos à temperatura de 16°C. Ao fechar as valvas para evitar salinidades baixas, os juvenis iniciam as vias metabólicas anaeróbias, no entanto, a temperatura aumenta a actividade metabólica e pode levar a uma acumulação mais rápida de produtos de excreção. Desta forma, ao fim de 24h de exposição, verificou-se que a maioria dos juvenis expostos à temperatura de 25°C, independentemente do IC, deixou de manter as valvas fechadas. Assim, pode aferir-se que o tempo que os juvenis de *V. corrugata* resistem em regime metabólico anaeróbio depende da temperatura. Este aspecto torna-se crítico, uma vez que a aquacultura é realizada em silos suspensos na água, ou seja, as amêijoas não têm possibilidade de se enterrar no sedimento para evitar as salinidades baixas e as temperaturas altas, ficando directamente expostas a essas variações. O aparecimento de sífões trilhados entre as valvas observou-se novamente em todas as réplicas com salinidades de 12,5 psu, em ambas as condições, e apareceu inicialmente nas réplicas do tratamento que apresentava maior pressão ambiental (12,5 psu e 25°C). Assim, corrobora-se a ideia de que o aumento da temperatura potencializa o stresse na amêijoa-macha quando esta está exposta a salinidades baixas.

#### **4.4. Stresse oxidativo**

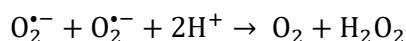
Para além das sobrevivência e alterações comportamentais, é possível avaliar o stresse dos indivíduos expostos a salinidades e temperaturas extremas através de biomarcadores. Sendo a amêijoa-macha um bivalve estuarino, estas variações são uma constante e esta presença frequentemente stresse hipossalino e termal. Torna-se importante avaliar de que forma estes organismos respondem bioquimicamente à interação das subidas na temperatura e descidas na salinidade, cenários previstos para o futuro em consequência das alterações climáticas (IPCC 2013;

Costa et al. 2012). Durante estes períodos, as espécies reactivas de oxigénio (ROS), normalmente produzidas pelos organismos durante o metabolismo celular (Rodriguez et al. 2004), poderão aumentar de concentração ultrapassando a capacidade de resposta das enzimas antioxidantes responsáveis por remover as ROS, originando stress oxidativo (Limón-Pacheco & Gonsebatt 2009). No presente trabalho, a avaliação do stress oxidativo serviu como ferramenta auxiliar para melhor avaliar o stress causado pela variação da salinidade e temperatura.

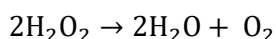
Importa explicar, neste contexto, que as ROS formadas durante o metabolismo celular podem ser de vários tipos: radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical ião superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) - a mais abundante ROS formada -, etc. Devido à sua elevada reactividade, algumas destas substâncias são altamente perigosas, podendo reagir com moléculas como lípidos, aminoácidos e nucleótidos, e conduzir à peroxidação lipídica (LPO), oxidação proteica, danos no DNA, degradação celular e podendo causar a morte, cancro ou degeneração dos tecidos (Matés 2000; Rodriguez et al. 2004).

De forma a proteger as células dos efeitos causados pelas ROS, os organismos apresentam uma série de enzimas antioxidantes, isto é, enzimas que atrasam ou previnem oxidação causada por qualquer substrato que possua tais características (Halliwell 1995), que são a primeira linha de defesa do sistema para a remoção dos ROS.

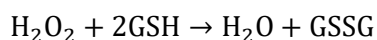
Após a formação do ião superóxido, a primeira reacção que ocorre é a dismutação desse ião em oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio através da enzima superóxido dismutase (SOD) (Lushchak 2014):



De seguida, o peróxido de hidrogénio pode ser metabolizado através de duas enzimas diferentes, a catalase (CAT) ou a glutathione peroxidase (GPx), ou pode converter-se no radical hidroxilo causando peroxidação lipídica e uma série de outros danos celulares (Rodriguez et al. 2004). A catalase, localizada nos peroxissomas, vai decompor o peróxido de hidrogénio em oxigénio molecular e água (Lushchak 2014):



A GPx, localizada no citosol e nas mitocôndrias, com o auxílio da glutathione reduzida (GSH), vai reduzir o peróxido de hidrogénio em água e glutathione oxidada (GSSG) (Lushchak 2014):



Outras enzimas relevantes para a protecção celular são: a glutathiona redutase (GR), que reduz a GSSG em GSH reestabelecendo o substrato para que a GPx possa actuar eliminando o peróxido de hidrogénio (Lushchak 2014), e a glutathiona-S-transferase (GST) que destoxifica a célula de compostos electrofílicos gerados ou compostos na forma de xenobióticos (Matés 2000).

As ROS produzidas pelos organismos durante condições de stresse podem resultar em danos moleculares e celulares e, no caso dos moluscos bivalves, pode conduzir à indução ou à inibição das enzimas antioxidantes (Matozzo et al. 2013).

Neste estudo, a enzima SOD não apresentou um padrão definido entre as diferentes salinidades, mas mostrou aumentar a sua actividade com o aumento da temperatura. O aumento da actividade da SOD permite uma maior estimulação da actividade da CAT, uma vez que há produção mais rápida de  $H_2O_2$  (Matozzo et al. 2013), no entanto, a actividade da CAT diminuiu nas temperaturas mais altas e provavelmente a GPx foi a enzima de destoxificação utilizada como resposta antioxidante dos indivíduos. Para as temperaturas de 16 e 19°C, verificou-se uma diminuição não linear da actividade com a diminuição da salinidade e a temperatura mostrou influenciar significativamente a actividade da CAT para a salinidade de 30 psu.

A actividade da GST a 16°C apresenta uma diminuição com a diminuição da salinidade, havendo uma maior protecção contra o stresse oxidativo em salinidades mais altas. Para as restantes temperaturas esta actividade apresenta variações não lineares. A temperatura mostrou influenciar significativamente a actividade da GST para a salinidade de 25 psu, sendo que a temperatura mais alta possui o menor nível de actividade. Para a salinidade de 15 psu há uma indução da actividade da GST com o aumento de temperatura de 16 para 19°C.

Apesar da indução das enzimas antioxidantes nas diferentes salinidades e temperaturas, os mecanismos de defesa foram insuficientes para evitar a peroxidação lipídica. Como verificado nos ensaios anteriores, *V. corrugata* é tolerante a um amplo intervalo de salinidades e temperaturas. É de esperar que a diminuição da salinidade e o aumento da temperatura promovam uma diminuição da capacidade antioxidante e um aumento da peroxidação lipídica. No entanto, esta mostra não ser significativa entre os diferentes tratamentos e assim, os danos celulares deverão ser semelhantes entre juvenis de *V. corrugata* expostos a salinidades de 30 a 15 psu e temperaturas de 16 a 25°C. Taylor et al. (2017) mostra que a temperatura é um factor mais relevante para o aumento da peroxidação lipídica do que a salinidade. Mostra também que o aumento de temperatura juntamente com a diminuição de salinidade, resulta em danos bioquímicos celulares, mortalidade elevada e diminuição da condição dos animais da espécie bivalve *Anadara trapezia*.

Um estudo semelhante com *V. corrugata* mostra que, para uma temperatura de 18°C, a partir da exposição a salinidades de 21 psu, a peroxidação lipídica aumenta com a diminuição da salinidade. Evidencia também que os valores da peroxidação lipídica para esta espécie de amêijoia são mais elevados comparando com a amêijoia-boa ou japónica (*Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*, respectivamente) para a mesma salinidade, temperatura e período de exposição (Carregosa et al. 2014).

Apesar dos vários estudos bioquímicos com bivalves adultos expostos a variações de salinidade ou temperatura (Carregosa et al. 2014; Velez et al. 2016; Nie et al. 2018; Gonçalves et al. 2017; Taylot et al. 2017), trabalhos com juvenis são praticamente inexistentes. Uma vez que ambos são fenómenos ambientais previstos com as alterações climáticas para os próximos anos e sendo a amêijoia-macha um bivalve com elevada importância comercial e produzido em aquacultura, as respostas bioquímicas dos juvenis são extremamente importantes. Nestes juvenis, tanto a GST como a SOD mostraram ter um papel importante na protecção celular dos organismos, ainda assim, a CAT é considerada neste estudo como a melhor enzima bioindicadora do stresse salino e térmico.

## Capítulo 5- Conclusão

A pré-engorda e engorda de amêijoia-macha em “Flupsy” mostra ser atrativa dado que este sistema aumenta a probabilidade de sobrevivência dos animais, promove um crescimento mais rápido e uniforme, facilita as amostragens e torna a manutenção mais simples. No entanto, uma vez que a produção dos juvenis é realizada em silos suspensos na água, as amêijoas ficam directamente expostas a variações de salinidade e temperatura, não tendo possibilidade de se enterrar no sedimento caso a salinidade baixe e a temperatura aumente, como seria de esperar em ambiente natural. Por esse motivo, colocou-se a hipótese de que a elevada mortalidade de amêijoia-macha, observada nos silos durante os meses de Abril e Maio de 2016 numa empresa de aquacultura na Ria de Aveiro, possa estar relacionada com a redução da salinidade e simultânea subida de temperatura observadas durante esse período. Para além disso, admitiu-se também, que o baixo índice de condição que os animais apresentavam nessa altura pudesse ter contribuído para a mortalidade observada.

É neste contexto que se insere o presente trabalho, o qual testa o efeito de concentrações salinas baixas e altas, assim como o efeito de temperaturas altas, na sobrevivência de juvenis de amêijoia-macha, considerando também índices de condição diferentes (aspecto também avaliado nesta dissertação em diferentes espécies de bivalves, locais, épocas do ano e estágios de desenvolvimento). O stresse oxidativo foi também avaliado como ferramenta auxiliar para melhor compreender o stresse causado nos indivíduos pela variação da salinidade e temperatura.

Na presente dissertação verificou-se que o IC dos bivalves estudados na Ria de Aveiro pode variar em função do local, época do ano e comprimento dos animais e que o IC dos juvenis é superior em Maio do que em Janeiro, enquanto nos adultos esta relação tende a ser inversa. Verificou-se ainda que o IC mostrou ter pouca influência na taxa de mortalidade dos animais expostos a stresse salino e/ou térmico.

A amêijoia-macha apresentou tolerância a temperaturas na água até 25°C durante 9 dias de exposição. Apresentou também capacidade de sobrevivência num intervalo de salinidade entre 17,5 e 45 psu, no entanto, observou-se mortalidade muito elevada a partir de 3 dias de exposição em salinidade  $\leq 15$  psu. Da mesma forma, nas salinidades mais altas (47,5 e 50 psu) observou-se uma mortalidade muito acentuada a partir de 3 dias de exposição. O tratamento com diminuição salina gradual induziu uma mortalidade mais baixa para o mesmo período de exposição comparado com o tratamento com diminuição salina repentina (choque). Observou-se ainda que os indivíduos responderam às mudanças abruptas de salinidade ( $\leq 15$  psu e  $\geq 47,5$  psu) através do fecho das valvas e começam a exibir os sífões trilhados entre as valvas após um curto período de tempo ( $\geq 24$ h) quando expostos nestas condições salinas adversas.

Os resultados do presente trabalho mostram ainda que a CAT, a GST e a SOD têm um papel importante na protecção celular dos juvenis, no entanto, apesar de ter ocorrido indução das enzimas antioxidantes nas diferentes salinidades e temperaturas, os mecanismos de defesa foram insuficientes para evitar a peroxidação lipídica nas células dos juvenis de amêijoa-macha.

De uma forma global, os resultados obtidos permitiram compreender que existe uma interacção entre a salinidade e a temperatura e que a temperatura alta potencializa a mortalidade de animais expostos a salinidades baixas. Com as previsões das alterações climáticas para o final do século em Portugal a indicarem uma subida global da temperatura e o aumento de eventos extremos de precipitação (IPCC 2013; Costa et al. 2012), a elevada mortalidade observada na empresa de aquacultura da Ria de Aveiro entre os meses de Abril e Maio de 2016 pode passar a ser um evento mais frequente em regime de aquacultura semi-intensivo com produção de bivalves em suspensão. Por esta razão, os aquacultores devem ter especial atenção para períodos do ano onde há maior probabilidade da salinidade baixa e da temperatura alta se associarem (ex.: primavera). Além disso, durante os períodos de intensa precipitação, independentemente da temperatura da água, uma das técnicas que os aquacultores têm ao seu dispor para evitar a diminuição excessiva da salinidade da água é a adição de sal nos tanques de cultivo. Sugere-se o uso desta técnica durante a estação das chuvas caso se verifique uma salinidade  $\leq 15$  psu, salinidade a partir da qual a amêijoa-macha não apresenta tolerância no curto prazo, sendo que a água salinizada a adicionar não pode ultrapassar os 45 psu e o ideal é manter-se nos 40 psu. Os resultados obtidos na presente dissertação contribuem, assim, para o melhoramento do cultivo de amêijoa-macha em suspensão, para o aumento da sua produção e para a intensificação da aquacultura regional e nacional.

## Referências Bibliográficas

- Albentosa, M., Beiras, R. & Camacho, A.P., 1994. Determination of optimal thermal conditions for growth of clam (*Venerupis pullastra*) seed. *Aquaculture*, 126(3–4), pp.315–328.
- André, C. & Lindegarth, M., 1995. Fertilization efficiency and gamete viability of a sessile, free-spawning bivalve, *Cerastoderma edule*. *Ophelia*, 43(3), pp.215–227.
- Aníbal, J., Esteves, E. & Rocha, C., 2011. Seasonal Variations in Gross Biochemical Composition, Percent Edibility, and Condition Index of the Clam *Ruditapes decussatus* Cultivated in the Ria Formosa (South Portugal). *Journal of Shellfish Research*, 30(1), pp.17–23. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.2983/035.030.0104>.



- Aranda-Burgos, J.A. et al., 2014. Embryonic and larval development of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia: Veneridae): A study of the shell differentiation process. *Journal of Molluscan Studies*, 80(1), pp.8–16.
- Bird, R.P., Draper, A.H., 1984. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods Enzymol.* 90, 105–110
- Berger, V.J. & Kharazova, A.D., 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia*, 355(Figure 1), pp.115–126.
- Bernardino, F.N. V, 2000. Review of aquaculture development in Portugal. *Journal of Applied Ichthyology*, 16(4–5), pp.196–199.
- Bertrand, C. et al., 2017. Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves : *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. *Ecological Indicators*, 74, pp.334–342. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.11.029>.
- Cairns, J., Heath, A.G. & Parker, B.C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia*, 47(1), pp.135–171.
- Calabrese, A. & Davis, H.C., 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Survival*, pp.427–436.
- Carregosa, V., Velez, C., et al., 2014. Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 177–178, pp.1–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>.
- Carregosa, V., Figueira, E., et al., 2014. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 171, pp.36–43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.009>.
- Chessa, G. et al., 2013. The floating upwelling system (FLUPSY) for breeding of *venerupis decussata* (linnaeus, 1758) juveniles in a coastal lagoon in sardinia (Italy). *Transitional Waters Bulletin*, 7(2), pp.53–61.
- Claiborne, A., 1985. CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 283–284.
- Costa, A.C., Santos, J.A. & Pinto, J.G., 2012. Climate change scenarios for precipitation extremes in Portugal. *Theoretical and Applied Climatology*, 108(1–2), pp.217–234. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00704-011-0528-3>.
- Da Ros, L., Bressan, M. & Gabriella Marin, M., 1985. Reproductive cycle of the mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) in Venice Lagoon (North Adriatic). *Bolletino di zoologia*, 52(3–4), pp.223–229.
- Dame, R.F., 1996. Chapter 4 Population Processes. In *Ecology of Marina Bivalves- An Ecosystem Approach*. pp. 75–109.

- Dawicki, S., 2009. NOAA Lab , N . Y . Town and Oyster Farmer Collaborate to Understand Potential Impact of Floating Nursery on Local Environment.
- DGRM, 2018. Limite diário de captura. Available at: <https://www.dgrm.mm.gov.pt/especies>.
- Edwards, P. & Demaine, H., 1998. 1. Defenitions. In *Rural Aquaculture: Overview and Framework for Country Reviews*. FAO, Rome.
- FAO, 2018a. Statistic. *Food and Agriculture Organization of the United Nation*. Available at: [http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb\\_ds=Aquaculture&tb\\_mode=TABLE&tb\\_act=SELECT&tb\\_grp=COUNTRY](http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb_ds=Aquaculture&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTRY)
- FAO, 2014. *The state of world fisheries and aquaculture*, Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:THE+STATE+OF+WORLD+FISHERIES+AND+AQUACULTURE#0>.
- FAO, 2018b. *Venerupis pullastra*. *Food and Agriculture Organization of the United Nation*. Available at: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Venerupis\\_pullastra/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Venerupis_pullastra/en) [Accessed February 21, 2018].
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2004. Part 2- Basic bivalve biology: taxonomy, anatomy and life history. In M. M. Helm, N. Bourne, & A. Lovatelli, eds. *Hatchery culture of bivalves - A practival manual*. Rome, pp. 19–29.
- Filgueira, R. et al., 2013. Bivalve condition index as an indicator of aquaculture intensity: A meta-analysis. *Ecological Indicators*, 25, pp.215–229. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.10.001>.
- Filho, D.W., Tribess, T., Gaspári, C., Cláudio, F.D., Torres, M.A., Magalhães, A.R.M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203, 149-158
- Flimlin, G.; R.C.E., 2000. Nursery and Growout Methods for Aquacultured Shellfish.
- Giri, U., Iqbal, M., Athar, M., 1996. Porphyrine-mediated photosensitization has a weak tumor promoting effect in mouse skin: possible role of in situ generated reactive oxygen species. *Carcinogenesis* 17, 2023-2028.
- Gonçalves, A.M.M. et al., 2017. The biochemical response of two commercial bivalve species to exposure to strong salinity changes illustrated by selected biomarkers. *Ecological Indicators*, 77, pp.59–66.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jokoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

- Halliwell, B., 1995. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), pp.1341–1348.
- Hauton, C., 2016. Effects of salinity as a stressor to aquatic invertebrates. In M. Solan & N. Whiteley, eds. *Stressors in the Marine Environment: Physiological and Ecological Responses*. Oxford University Press, GB, pp. 3–24.
- Helm, M.M. & Bourne, N., 2004. Part 2 - Basic bivalve biology: taxonomy, anatomy and life history. In A. Lovatelli, ed. *Hatchery culture of bivalves: A practical manual*. FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Rome, pp. 19–29.
- Hernández, J.M. et al., 2011. *Moluscos y conchas marinas de Canarias*.
- Hosoi, M., Kubota, S., Toyohara, M., Toyohara, H., Hayashi, I., 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fish. Sci.* 69, 395–400.
- IPCC, 2013. Rhein, M., S.R. Rintoul, S. Aoki, E. Campos, D. Chambers, R.A. Feely, S. Gulev, G.C. Johnson, S.A. Josey, A. Kostianoy, C. Mauritzen, D. Roemmich, L.D. Talley and F. Wang, 2013: Observations: Ocean. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- IPMA, 2017. Zonas de produção de Bivalves. Available at: <http://www.ipma.pt/pt/bivalves/zonas/>.
- Joaquim, S. et al., 2011. Reproductive activity and biochemical composition of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia) from Ria de Aveiro (northwestern coast of Portugal). *Scientia Marina*, 75(2), pp.217–226.
- Jones, G.G., Sanford, C.L. & Jones, B.L., 1993. *Manila Clams : Hatchery and Nursery Methods*.
- Jørgensen, C.B., 1990. Introduction. In *Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology*. pp. 3–4.
- Klaassen, C.D., 2008. General Principles of Toxicology. In Casarett and Doull's Toxicology: The basic Science of Poisons. Seventh Edition. p.3. Available at: <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0726/2007015656-b.html>.
- Kim, W.S. et al., 2001. Effects of salinity on endogenous rhythm of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Marine Biology*, 138(1), pp.157–162. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035124341&partnerID=tZOTx3y1>.
- Kurihara, T., 2017. Tolerance of the bivalve *Trapezium liratum* (Reeve, 1843) to decrease in salinity. *Plankton Benthos Research*, 12(1), pp.44–52.
- Le, D. V. et al., 2017. Establishing the thermal window for aerobic scope in New Zealand geoduck clams (*Panopea zelandica*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 187(2), pp.265–276.

- Limón-Pacheco, J. & Gensebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1–2), pp.137–147.
- Lucas, A. & Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44(3), pp.187–200.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, pp.164–175. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
- Macedo, M.C., Macedo, M.I. & Borges, J.P., 1999. Classe Bivalvia. In *Conchas Marinhas de Portugal*. pp. 375–482.
- Maia, F., 2006. Estudo do ciclo reprodutor e do crescimento de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ria de Aveiro. Contributo para a gestão destes recursos pesqueiros. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro. Available at: <http://ria.ua.pt/bitstream/10773/4943/1/206816.pdf>. 30pp
- Maia, F., Sobral, M.P., Gaspar, M., et al., 2006. Estudo do crescimento de *Solen marginatus* e de *Venerupis pullastra* na Ria de Aveiro: Bases científicas para a gestão destes recursos. *Relatórios científicos e técnicos do IPIMAR*.
- Maia, F., Sobral, M.P. & Gaspar, M., 2006. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ria de Aveiro. *Relatórios científicos e técnicos IPIMAR, Série digital*. \r(<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>), 30, p.36.
- Mohammed, R. & Scholz, M., 2017. Critical review of salinity intrusion in rivers and estuaries. *Journal of Water and Climate Change*, pp.1–16.
- Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1–3), pp.83–104. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X00003061>.
- Matozzo, V. et al., 2013. Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Marine Pollution Bulletin*, 72(1), pp.34–40. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.004>.
- Mohammed, R. & Scholz, M., 2017. Critical review of salinity intrusion in rivers and estuaries. *Journal of Water and Climate Change*, pp.1–16.
- Nie, H. et al., 2017. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion in different colour strains of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture Research*, 48(6), pp.2778–2786.
- Nie, H. et al., 2018. Physiological and biochemical responses of *Dosinia corrugata* to different thermal and salinity stressors. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, (September 2017), pp.1–8.

- Parker, L.M. et al., 2017. Ocean acidification narrows the acute thermal and salinity tolerance of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1–2), pp.263–271. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.052>.
- Pawiro, S., 2010. Bivalves: Global production and trade trends. *Safe management of shellfish and harvest waters*, pp.11–19.
- Peddicord, R.K., 1977. Salinity and substratum effects on condition index of the bivalve *Rangia cuneata*. *Marine Biology*, 39(4), pp.351–360.
- Pessoa, M.F. & Oliveira, J., 2006. A Ostricultura no estuário do Sado : perspectivas de sua recuperação. 1a Conferência Lusófona sobre o Sistema Terra - CluSTer, (1), pp.5–8.
- Quayle, D.B., 1951. VII.-Structure and Biology of the larva and Spat os *Venerupis pullastra* (Montagu). *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 62(01):255 - 297 · January 1951, (8), pp.255–298.
- Riisgård, H.U. et al., 2014. Effect of Salinity-Changing Rates on Filtration Activity of Mussels from Two Sites within the Baltic Mytilus Hybrid Zone:The Brackish Great Belt (Denmark) and the Low Saline Central Baltic Sea. *Open Journal of Marine Science*, 4(2), pp.101–109. Available at: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ojms.2014.42011>.
- Ringwood, A. & Keppler, C., 2002. Water Quality Variation and Clam Growth : Is pH Really a Non-issue in Estuaries ? , 25(5), pp.901–907.
- Rodriguez, C. et al., 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*, 36(1), pp.1–9.
- Stellman, J., 1998. Chapter 33- Toxicology. In E. K. Silbergeld, ed. *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety*. p. 33.3.
- Shumway, S.E., 1977. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. *Marine Biology*, 41(2), pp.153–177.
- Sobral, P. & Widdows, J., 1997. Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* ( L .), from southern Portugal \*. , 61(1), pp.163–171.
- Taylor, A.M., Maher, W.A. & Ubrihien, R.P., 2017. Mortality, condition index and cellular responses of *Anadara trapezia* to combined salinity and temperature stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 497(January), pp.172–179. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2017.09.023>.
- Velez, C. et al., 2014. Bioaccumulation patterns, element partitioning and biochemical performance of *Venerupis corrugata* from a low contaminated system. *Environmental Toxicology*, 24(3), p.n/a-n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.22070>.
- Velez, C. et al., 2016. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes. *Science of the Total Environment*, 566–567, pp.260–268. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.019>.

- Verdelhos, T., Marques, J.C. & Anastácio, P., 2015. The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule* , illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay. *Ecological Indicators*, 52, pp.96–104. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.11.022>.
- Walne, P.R., 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture*, 8(4), pp.371–381.
- Woolley, A., 2008. A Guide to Practical Toxicology; Evaluation, Prediction, And Risk. p.7
- Yildiz, H., Palaz, M. & Bulut, M., 2006. Condition indices of mediterranean mussels (*Mytilus gallprovincialis* L.1819) growing on suspended ropes in dardnelles. *Journal of Food Technology*, 4, p.221–224.